

博士論文

高速一分子観察を用いた
分子モーターキネシンの協調的運動の研究

松崎 興平

目次

第1章 序論.....	3
1.1 キネシンとは.....	3
1.2 キネシンの構造.....	5
1.3 キネシンの運動観察.....	6
1.4 Hand-over-hand ステップと ATP 加水分解の共役.....	11
1.5 頭部間の協調的な加水分解.....	13
1.5.1 前頭部の解離を抑制するメカニズム.....	19
1.5.2 浮いた頭部が前方に選択的に結合するメカニズム.....	24
1.6 研究の目的と方法.....	29
1.7 本論文の構成.....	35
第2章 実験方法.....	36
2.1 試料の作成.....	36
2.1.1 本研究で用いたキネシン変異体.....	36
2.1.2 キネシンの発現および精製.....	37
2.1.3 キネシンへの金コロイド粒子の標識.....	38
2.1.4 観察用微小管の重合.....	39
2.2 顕微鏡観察.....	40
2.2.1 観察用フローセルの作成.....	40
2.2.2 全反射暗視野顕微鏡による観察.....	41
2.2.3 データの解析.....	42
第3章 E236A ヘテロダイマーの高時間分解能観察.....	45
3.1 E236A ヘテロダイマー野生型頭部の運動観察.....	48
3.2 ネックリンカーを伸長した E236A ヘテロダイマー野生型頭部の運動観察.....	53
3.3 本章のまとめと考察.....	55
第4章 タンデムキネシンの高時間分解能観察.....	56
4.1 金コロイド標識下タンデムキネシンの運動速度.....	59
4.2 タンデムキネシンのステップ検出.....	65
4.3 タンデムキネシンのステップの分類.....	71
4.4 微小管への結合状態と解離状態の持続時間.....	75

4.5 解離状態での頭部のブラウン運動	85
4.6 ネックリンカー変異体タンデムキネシンの運動観察	93
4.7 本章のまとめと考察	97
第5章 アンカーされたキネシン頭部の結合解離の高時間分解能観察.....	99
5.1 ATP 存在下でのアンカーモノマーの運動観察.....	100
5.2 ATP·Pi 条件下でのアンカーモノマーの運動観察	106
5.3 ADP 存在下でのアンカーモノマーの運動観察	108
5.4 ADP-SO ₄ 条件下でのアンカーモノマーの運動観察	112
5.5 本章のまとめと考察	119
第6章 本研究のまとめ.....	121
6.1 実験結果のまとめ	121
6.2 キネシンの効率的二足歩行におけるネックリンカーの役割.....	124
6.2.1 ネックリンカーの向きによる ATP 加水分解の制御.....	124
6.2.2 Biased binding メカニズムによる浮いた頭部の選択的前方ステップ	124
6.2.3 ネックリンカードッキングによる、弱結合状態の頭部における ADP 解離の 制御	125
謝辞	128
参考文献	129

第 1 章 序論

1.1 キネシンとは

生体細胞内では DNA 配列にコードされた一次配列に基いてアミノ酸を重合することによって様々な機能を持つタンパク質が生み出されている。その中でも ATP 加水分解エネルギーを力学的仕事に変換する機能を持つタンパク質の一群をモータータンパク質と呼び、回転モーターと線型モーターに分けられる。線型モーターの一種であるキネシンは微小管と呼ばれるフィラメント状タンパク質上を一方向に運動することによって細胞内輸送や細胞分裂に関わっていることが知られている。

キネシンははじめイカの神経軸索から発見された[Vale, 1985]。その後の研究により機能や構造の異なる多くのキネシンサブファミリーが発見され、ゲノム的アプローチにより 14 のスーパーファミリーに分類されている[Lawrence, 2004]。現在では最初に発見されたキネシンはキネシン-1、あるいは従来型キネシン (conventional kinesin) と呼ばれており、微小管上を運動することにより輸送小胞や細胞内小器官を輸送する役割を担っていることが知られている[Vale, 2003] (図 1.1)。本研究ではキネシン-1 に焦点を当て、キネシンが化学的エネルギーを用いて運動するメカニズムについて研究を行った。

微小管とは細胞骨格の一種であり、外径 24 nm 程度のチューブ状の構造をしており、 α チューブリンと β チューブリンのヘテロ二量体が直線的に重合したプロトフィラメントが 13 本結合することで形成される (図 1.2)。ヘテロ二量体の繰り返し構造により、微小管は 8 nm の周期性を持つ[Amos, 1974]。また微小管には極性があり、 β チューブリン側をプラス端、 α チューブリン側をマイナス端と呼ぶ。ヘテロ二量体は微小管のプラス端、マイナス端のどちらにも重合しどちらからも解離するが、GTP 型チューブリンはプラス端で重合しやすく GDP 型チューブリンはマイナス端で解離しやすいことが知られている[Kirschner, 1984]。細胞内において微小管は中心体からプラス端を細胞の外側に向けた構造をしており、キネシン-1 はプラス端方向に向かって運動することで荷物を細胞周辺へと輸送する。

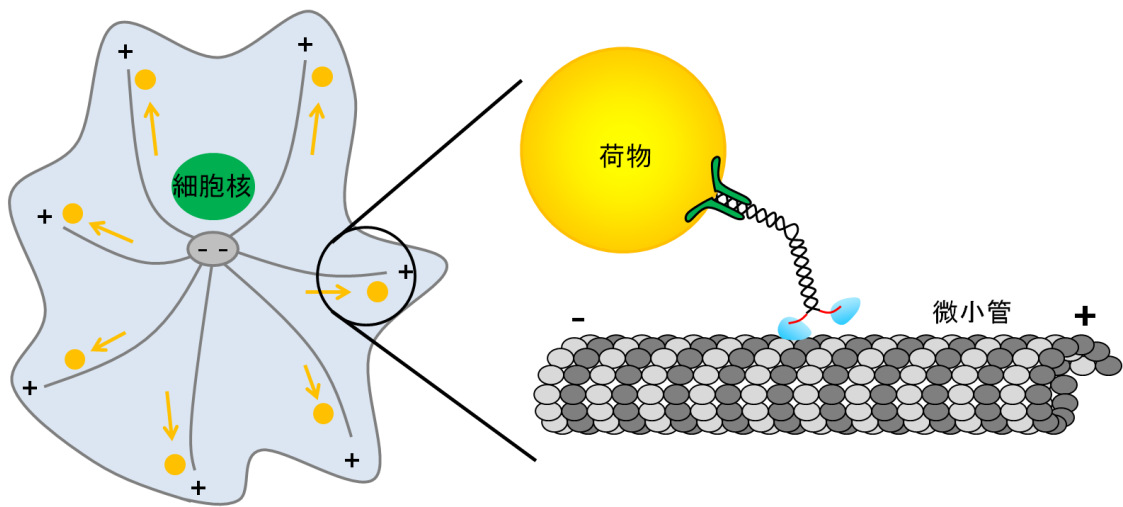


図 1.1 キネシン-1 による微小管のプラス端方向への物質輸送

輸送小胞や細胞内小器官（リソソーム、ミトコンドリア）は拡散によって細胞内に分配されるにはサイズが大きすぎる。キネシン-1 はそれらの荷物を細胞周辺に向けて輸送することで細胞内に分配する役割を担っている。

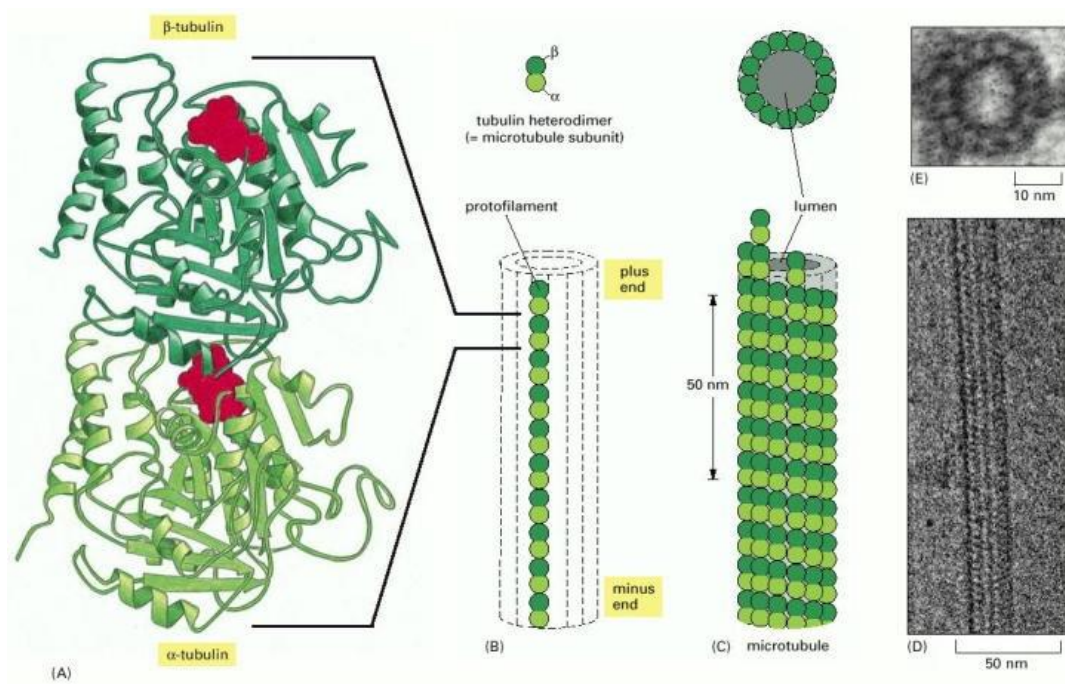


図 1.2 微小管の構造（“Molecular Biology of the Cell”より引用）

(A)αチューブリンとβチューブリンのヘテロ二量体。(B)ヘテロ二量体が重合することでプロトフィラメントが形成され、(C)プロトフィラメントが 13 本結合することで微小管が形成される。(D),(E)電子顕微鏡により撮影された微小管

1.2 キネシンの構造

キネシン-1 (以後は単にキネシンと呼ぶ) は 2 本の重鎖からなる二量体に 2 本の軽鎖が結合した構造をしている [Vale, 2003]。重鎖は 960 残基程度のアミノ酸からなり、C 末端側から尾部、茎部、頭部の 3 つの領域に分けられる [Hirokawa, 1989]。尾部は軽鎖とともに荷物と結合する部位であり、また荷物がないときには頭部と結合することで酵素活性を抑制することが知られている [Hackney, 1992]。中間領域の茎部は 2 本のヘリックスが絡まり合いコイルドコイルを形成することによって重鎖を二量体化している。頭部 (~340 アミノ酸) は ATP と特異的に結合し加水分解するモータードメインであると同時に、微小管との相互作用を行う領域であり、キネシンの運動において重要な役割を担っている。電子顕微鏡や X 線結晶構造解析を用いた研究により、頭部は微小管上に 8 nm おきに存在するチューブリン二量体の α チューブリンと β チューブリンの間の位置に特異的に結合することが明らかになっている [Gigant, 2013] (図 1.4)。

頭部と微小管との親和性は頭部のヌクレオチド状態と共役している [Romberg, 1993]。頭部がヌクレオチドフリー状態であるときには頭部と微小管の親和性は高く、微小管との安定的な複合体を形成する。微小管に結合した頭部に ATP が結合したあと、ATP が加水分解されると ADP-Pi 状態となるが、これら 2 状態でも頭部と微小管の親和性は高く頭部は強結合状態を維持する。その後 Pi を解離し ADP 状態となった頭部では微小管との親和性が低下し速やかに微小管から解離する。解離した頭部が弱い親和性によって再び微小管上の結合部位に戻ると、ADP が解離し再び結合が安定化する (図 1.5A)。このスキームでは ADP を結合した頭部が微小管に弱く結合している中間状態 (ADP-微小管弱結合状態) が 2 つ存在するが、このスキームを満たすためには、リン酸解離直後の ADP 状態ではすみやかに微小管から解離し、その後再び微小管に弱く結合したあとは ADP を解離するという異なる制御を受ける必要がある。従って、これら 2 つの ADP-微小管弱結合状態では何らかの状態の違いが存在すると考えられるが、それを裏付ける証拠は得られていない [Gilbert, 1995]。

また、頭部と茎部をつなぐネックリンカー (323-336 番目の 14 残基) の構造もヌクレオチド状態によって変化することが知られている [Rice, 1999]。ADP 状態やヌクレオチドフリー状態ではネックリンカーは無秩序な状態にありランダムな構造を取っているが、ATP 状態や ADP-Pi 状態ではネックリンカーは頭部と特異的に結合することで末端が微小管のプラス端方向を向き、さらに 2 つの β シート構造が形成される。この構

造変化をネックリンカードッキングと呼ぶ (図 1.5B)。

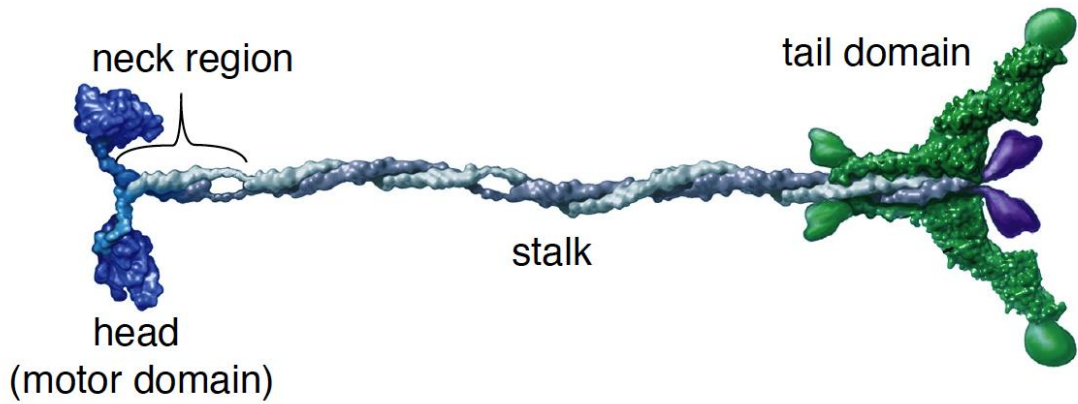


図 1.3 キネシンの構造図 ([Vale, 2003]より引用)

キネシンは2本の重鎖が二量体化した構造をしており、重鎖は尾部、茎部、頭部に分けられる。

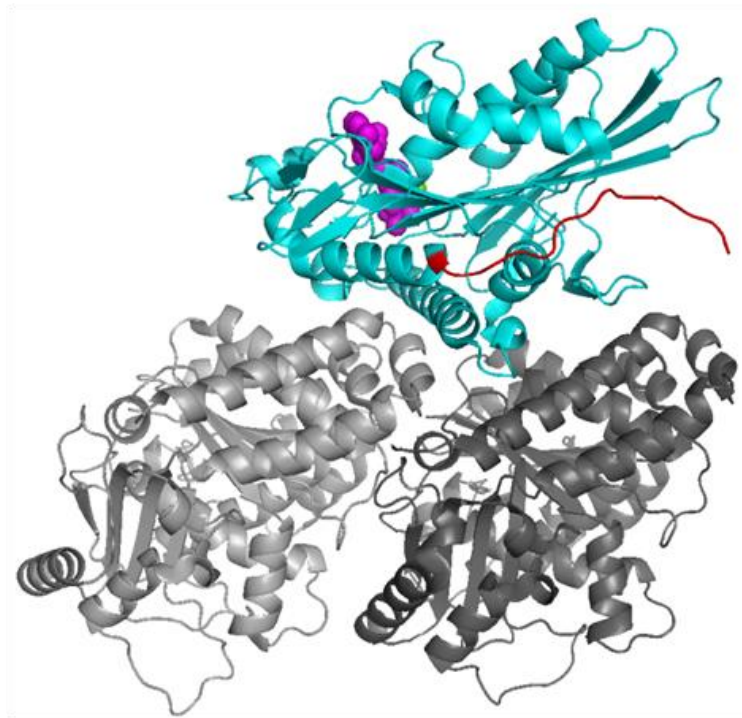


図 1.4 キネシン頭部とチューブリンヘテロダイマーの結合 ([Gigant, 2013]より引用)

X線結晶構造解析により明らかになったキネシン-チューブリン複合体の三次元構造。キネシン頭部 (シアン) は α チューブリン (灰色) と β チューブリン (濃灰色) の間に特異的に結合する。マゼンダは ATP、赤はネックリンカーを表す。

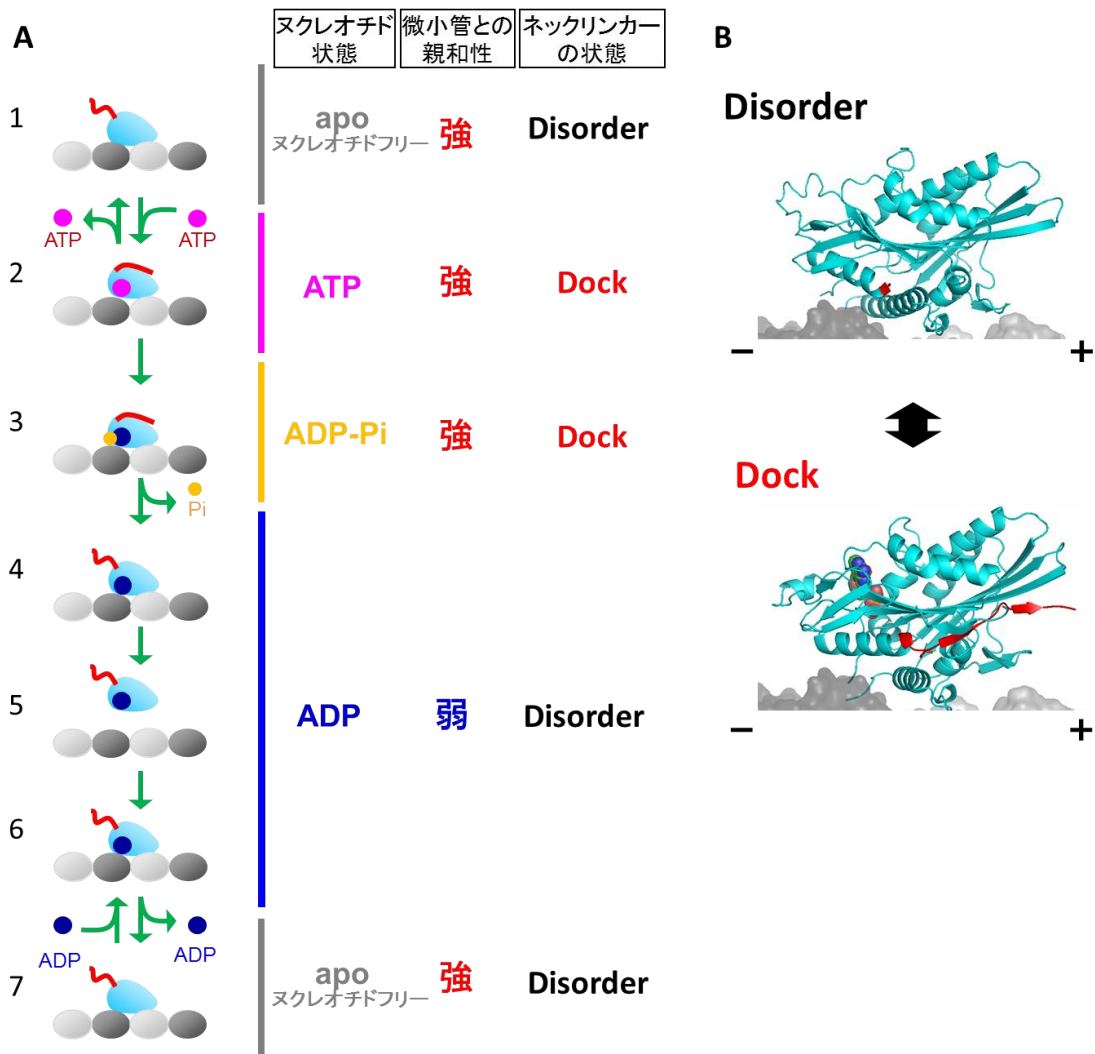


図 1.5 頭部のヌクレオチド状態と微小管親和性およびネックリンカーの構造状態の共役
 (A) 頭部は ATP 加水分解サイクルと共役して微小管との解離結合を繰り返す。ヌクレオチドフリー状態から ADP-Pi 状態まで (1-3) は、頭部は微小管に強く結合している。リン酸が解離する(4)と頭部と微小管との親和性が低下し頭部は微小管から解離する (4→5)。微小管上で ADP が解離すると再び微小管に強く結合する (6→7)。(B) 頭部はヌクレオチドフリー状態および ADP 状態にあるときネックリンカーは特定の構造を取らないが、ATP 状態および ADP-Pi 状態ではβシート構造を形成し頭部とドッキングすることでネックリンカーの末端が微小管のプラス端方向を向く。

1.3 キネシンの運動の一分子観察

キネシンの運動は主に一分子蛍光観察や光ピンセット法を用いて研究されてきた。ガラス表面に吸着した微小管上を蛍光標識したキネシンが運動する様子を全反射顕微鏡を用いて観察することにより、キネシン 1 分子の運動を観察することができる。この実験から、キネシンは 1 分子で連続的に 1 μm 程度運動し、その平均速度は 600 nm/s 程度であることが明らかになった[Vale, 1996]。一方、キネシンの C 末端に結合したビーズを光ピンセットを用いてトラップし、ビーズの位置を nm 精度で測定する実験により、キネシンの重心位置は 8 nm ステップで運動することが明らかになった[Svoboda, 1993]。このステップサイズは微小管の周期性と一致する。また、光ピンセットを用いた実験により、キネシンの運動速度は後ろ向きにかかる負荷が増大すると低下し、最大力が 7 pN 程度であることも明らかになった[Svoboda, 1994][Kojima, 1997] (図 1.6)。

2 つの頭部を用いて連続的にステップ運動するためには、一方の頭部が微小管に結合した状態を維持したままもう一方の頭部が前にステップする必要がある。そのように 8 nm ずつステップする方法として次の 2 つのモデルが提唱された。一つは Hand-over-hand モデルで、このモデルでは一方の頭部がもう一方の頭部を追い越しながら歩くように運動する。もう一つは Inchworm モデルで、こちらのモデルでは後ろにある頭部がもう一方の頭部を追い越すことはなく、頭部間の距離を伸び縮みさせることで尺取り虫のように運動する。どちらのモデルでもキネシンは全体として 8 nm ずつステップするが、2 つのモデルで頭部の移動距離に違いがある。Hand-over-hand モデルでは解離した後ろの頭部はもう一方の頭部を追い越し 2 つ先の 16 nm 前方の結合サイトに結合し全体として 8 nm 前進するが、Inchworm モデルでは 2 つの頭部がどちらも 8 nm 前方にステップすることで全体として 8 nm 前進する。したがって頭部を蛍光標識しステップを検出することでどちらのモデルが正しいか検証することができる。

FIONA (fluorescence imaging one-nanometer accuracy) とは CCD カメラで得られた蛍光輝点の画像を二次元ガウス関数でフィッティングすることにより高い位置決定精度を得る方法である。精度よくフィッティングを行うためには輝点の積算時間を長くし S/N の良いガウシアンカーブを得る必要があるが、蛍光色素 Cy3 を用いた FIONA では輝点の重心位置を 0.5 秒の時間分解能で 1.5 nm の精度で決定することができた。Cy3 を用いた FIONA を用いて低 ATP 濃度で運動中のキネシン頭部の運動を観察した実験により片方の頭部は 16 nm ステップすることが示された[Yildiz, 2004] (図 1.7)。

この結果から、現在ではキネシンの運動モデルとして Hand-over-hand モデルが広く受け入れられている。

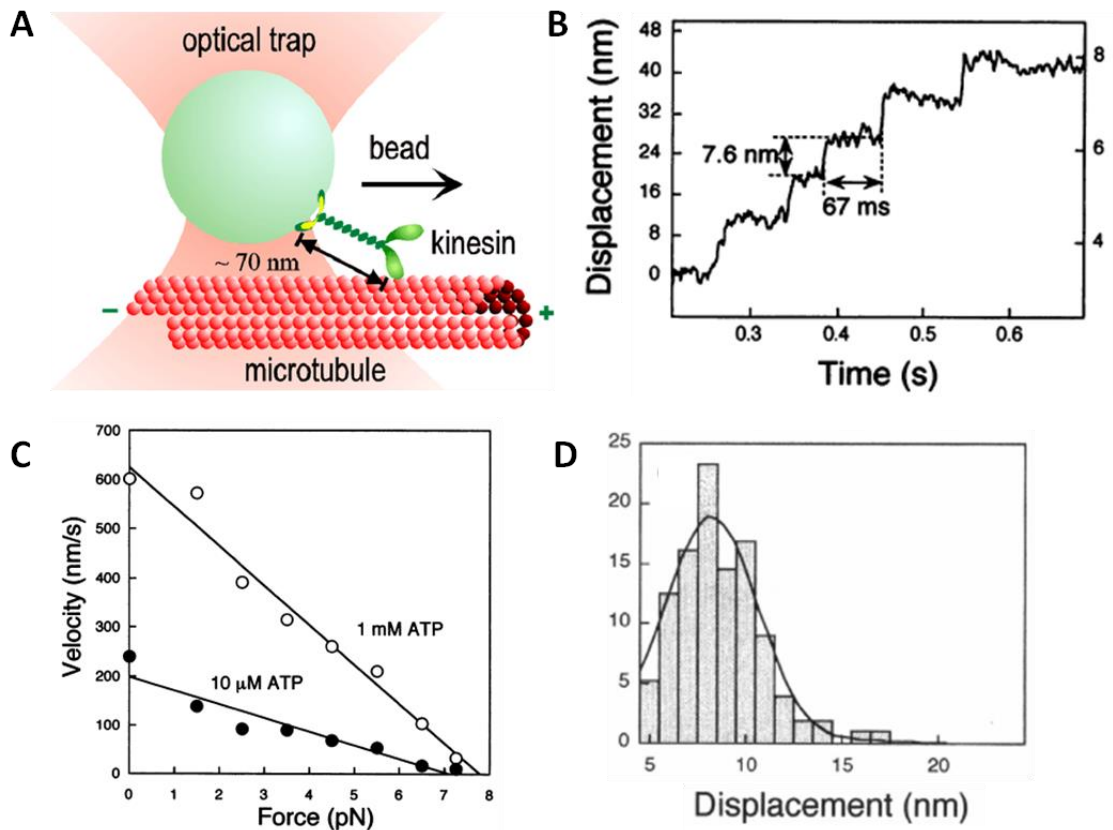


図 1.6 光ピンセット法を用いたキネシンの運動観察

(A) 実験系の概念図。図は Block lab のホームページより引用

(<https://web.stanford.edu/group/blocklab/kinesin/kinesin.html>) (B) 光ピンセットを用いて得られたビーズの運動のトレース。(C) 運動速度の負荷依存性。負荷が増大すると運動速度は低下し、約 7 pN の負荷がかかると停止した。(D) ビーズのステップサイズのヒストグラム。ピーク位置は 8.2 nm。(B)(C)(D)は[Kojima, 1997]より引用

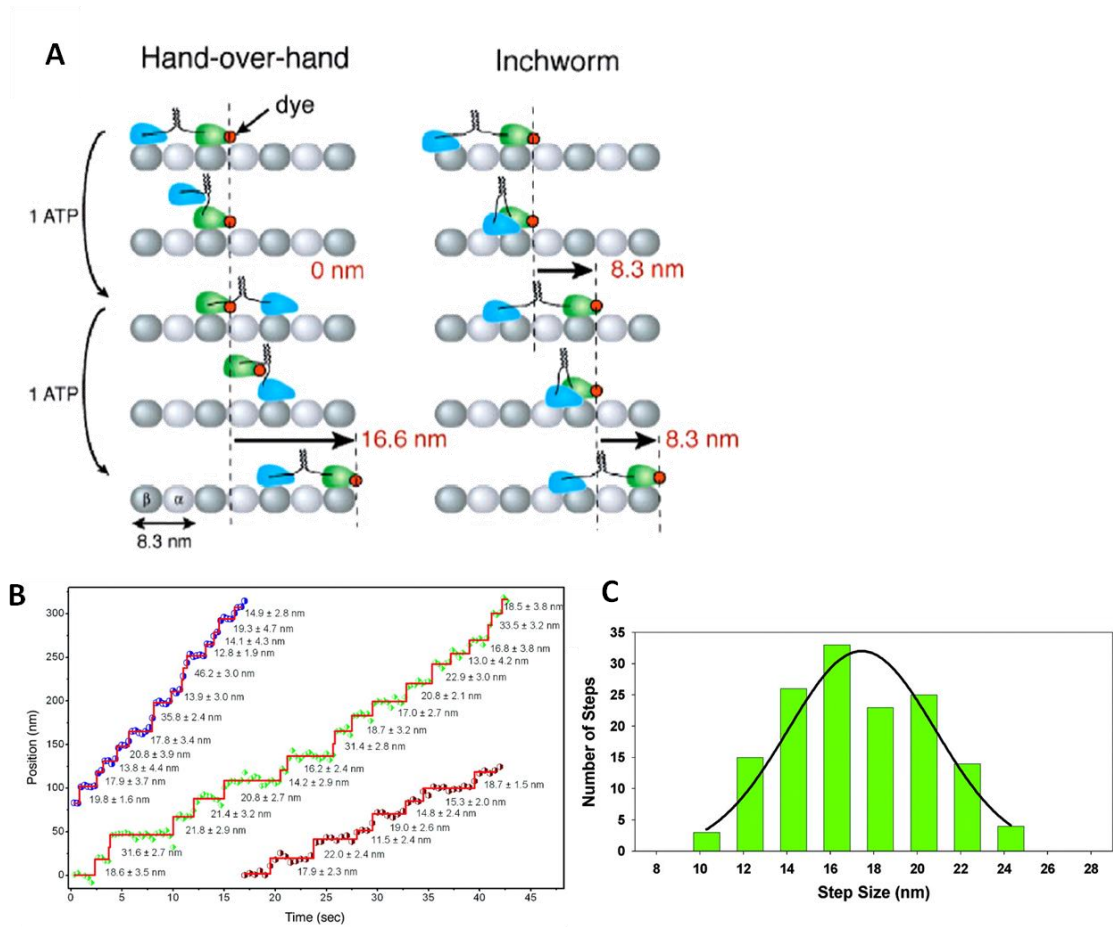


図 1.7 FIONA を用いた片方の頭部につけた蛍光色素のナノ計測 ([Yildiz, 2004]より引用)
 (A) Hand-over-hand モデルと Inchworm モデル。どちらのモデルでも 1 サイクルで全体として 8 nm 進むが、Hand-over-hand モデルでは標識した頭部は 16 nm ずつ前進し、Inchworm では標識した頭部は 8 nm ずつ前進すると考えられる。(B) FIONA を用いて観察された 340 nM ATP 条件下におけるキネシン頭部につけた蛍光色素の運動トレース。(C) (B)から求めたステップサイズのヒストグラム。17.3 nm にピークを持つことから Hand-over-hand モデルが支持された。

1.4 キネシンの一方向性のステップと ATP 加水分解の共役

キネシンの Hand-over-hand モデルに従った連続的歩行運動は、ATP 加水分解反応と共役している。キネシンの 8 nm ステップの持続時間を解析した研究や一分子観察と ATP 加水分解速度測定を比較した研究などにより、キネシンの 8 nm ステップは 1 個 ATP 分子の加水分解と共役していることが明らかにされた[Schnitzer, 1997] [Hua, 1997]。しかし、Hand-over-hand ステップと ATP 加水分解サイクルの対応関係は不明瞭であった。特に ATP 結合のは両足結合状態で起きるとい説と片足結合状態で起きるとい説で長く論争が続いており、二量体のキネシンで ATP の結合が 2 つ目の頭部からの ADP 解離の引き金になることを明らかにした生化学的研究により片足結合状態説が示唆されていたが[Hackney, 1994]、直接的な証拠は得られていなかった。

Mori らは一分子 FRET (Fluorescence resonance energy transfer) 法を用いた研究により、ATP の結合は片足結合状態で行われることを明らかにした[Mori, 2007]。FRET とは励起波長と蛍光波長のスペクトルに重なりを持つ 2 つの蛍光色素間でエネルギーが移動する現象であり、そのエネルギー移動の効率 (FRET 効率) は色素間の距離に依存する。蛍光色素 Cy3 および Cy5 をキネシンの 2 つの頭部のそれぞれ先端と後端に標識することで両足結合状態 (FRET 効率:10 % or 90 %) と片足結合状態 (30 %) を区別することができた (図 1.8A)。高 ATP 濃度条件下で運動するキネシンでは FRET 効率のピークは 10 % と 90 % の中間である 50 % となったものの、低 ATP 濃度条件下では 30 % となったことから、高 ATP 濃度条件下では両足結合状態が支配的であり、低 ATP 濃度条件下では片足結合状態が支配的であることが明らかになった (図 1.8B)。この結果はキネシンが片足結合状態で ATP 結合を待つことを示唆している。

これらの結果から、ATP 加水分解と共役した一方向性ステップの運動スキームが明らかになった。まず後ろ頭部が ATP 結合状態、前頭部がヌクレオチドフリーの両足結合状態で、先に後ろ頭部の ATP が加水分解され、リン酸の解離に伴ってその頭部が解離する。次に微小管に結合した頭部に ATP が結合すると、浮いた頭部は元いた場所の 16 nm 前方の結合部位で ADP を解離し微小管に結合する。このようにして Hand-over-hand モデルによるステップ運動が ATP 加水分解と共役していると考えられる (図 1.9)。

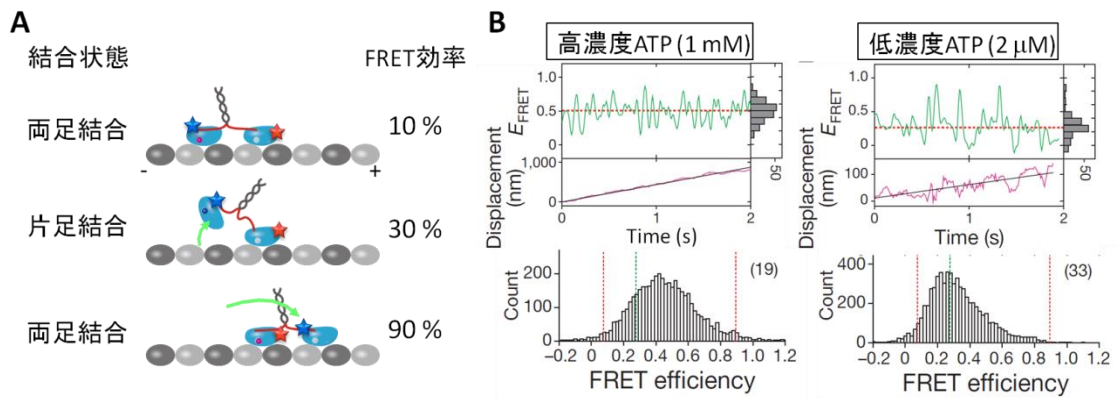


図 1.8 一分子 FRET 法を用いた構造変化の検出 ([Mori, 2007]より引用)

(A) キネシンの2つの頭部のそれぞれ先端と後端にドナー色素 (Cy3) とアクセプター色素 (Cy5) を標識することで、片足結合状態と両足結合状態を FRET 効率の違いにより区別することができる。(B) 運動中のキネシンで FRET 効率の時間変化を観察した結果、高 ATP 濃度では両足結合状態が支配的であり、低 ATP 濃度では片足結合状態が支配的であることが明らかになった。この結果から、キネシンは片足結合状態で ATP の結合を待っていることが示された。

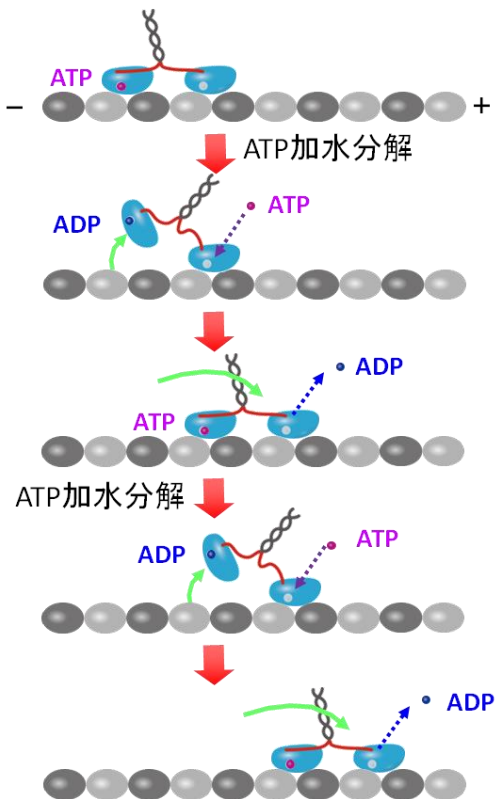


図 1.9 ATP 加水分解と共役したキネシンの運動サイクル

まず後ろ頭部が ATP 状態、前頭部がヌクレオチドフリーの両足結合状態で、後ろ頭部の ATP が加水分解されたあと、リン酸の解離に伴って後ろ頭部が解離する。次に微小管に結合した頭部に ATP が結合すると、浮いた頭部は元いた場所の 16 nm 前方の結合部位で ADP を解離し一歩前にステップする。以下同様にステップを繰り返すことでキネシンは連続的歩行を行うと考えられる。

1.5 頭部間の協調的な加水分解反応制御

このようにキネシンの Hand-over-hand モデルによる運動サイクルは ATP 加水分解と共役していることが明らかになってきたが、Hand-over-hand モデルによって一方向に運動するためには、(1)両足結合状態で必ず後ろ頭部が先に解離し、(2)片足結合状態で必ず 16 nm 前方の結合部位に浮いた頭部が結合する必要がある。2 つの頭部は全く同一の構造を持つため、このような協調的な加水分解制御が行われるためには頭部間で情報のやり取りが行われ、それぞれの頭部が自らの位置関係を認識する仕組みが必要である。Yildiz は頭部と頭部を繋ぐネックリンカーに着目し、ネックリンカーを人工的に伸長し頭部間の張力を緩和した変異体を観察することで、ネックリンカーの張力が頭部間の協調性に重要であることを明らかにした[Yildiz, 2008] (図 1.10)。ATP 加水分解あたりのステップ数を表す Coupling ratio は

$$\text{Coupling ratio} = \frac{\text{運動速度} / 8 \text{ nm}}{\text{ATP 加水分解速度}}$$

という式で与えられ、野生型のキネシンでは 1 に近いが、ネックリンカーを伸長すると伸長距離に応じて Coupling ratio が低下した。1 より小さい Coupling ratio は前進を伴わない ATP 加水分解が存在することを意味するため、ネックリンカー伸長変位体では前頭部の解離あるいは解離した後ろ頭部の再結合などの、キネシンの正常な加水分解サイクル (On-pathway) から外れた Off-pathway の加水分解が起きていることが示唆される。この結果から、頭部間の協調的な加水分解制御にはネックリンカーの張力が重要であることが示唆された。

On-pathway の加水分解反応は前方へのステップを伴うため光ピンセット法や FIONA を用いて検出することができるが、Off-pathway の加水分解反応は頭部の変位を伴わず、また解離後の再結合が FIONA の時間分解能よりも速く起きるため、FIONA では Off-pathway の加水分解が起きる頻度を直接測定することはできなかった。Isojima らはキネシンの頭部を金コロイド粒子で標識し、その運動を全反射型の暗視野顕微鏡で 55 μs の時間分解能で観察することにより、運動中のキネシンにおける頭部が微小管から解離した状態 (Unbound 状態) を直接検出することに成功した[Isojima, 2016] (図 1.12)。Ueno らによって開発された全反射型の暗視野顕微鏡は、対物型エバネッセント照明を散乱照明に用いることで、従来型の暗視野顕微鏡と比べ S/N が大幅に改善されている。高速カメラを用いて撮影した散乱画像の分布を二次元ガウス関数で

フィッティングすることで、直径 40 nm の金コロイド粒子の重心位置を 9.1 μs の時間分解能で 1.8 nm の位置決定精度で求めることができた (図 2.3 [Ueno, 2010])。Isojima らはこの顕微鏡を用いてキネシン頭部に標識した金コロイド粒子を 55 μs の時間分解能で撮影することで、野生型のキネシンでは Unbound 状態のあと、後ろの結合部位に再結合する頻度は低く、Unbound 状態の 98 %が 16 nm 先の結合部位への結合であることを示した。また、Unbound 状態の持続時間は ATP 濃度に依存しており、その逆数はミカエリス・メンテン式でよくフィッティングできた。この結果は Unbound 状態には ATP 依存的過程と ATP 非依存的過程の 2 つが存在することを意味しており、ATP 結合が片足結合状態で行われるとする結果を支持するものである。また、運動中のキネシンにおける頭部が解離した状態の直接観察は光ピンセットによってキネシンの片方の頭部をトラップし運動を観察した研究によってもなされており、ATP 濃度が高いほど頭部が解離した状態の持続時間が短くなることが明らかになっている [Guydosh, 2009]。

Unbound 状態における頭部につけた金コロイド粒子のゆらぎの分布位置から、前頭部が先に微小管から解離した場合と後ろ頭部が先に解離した場合を区別することができる (図 1.13A)。Isojima らは全反射型暗視野顕微鏡を用いてネックリンカーを人工的に伸長した変異体を高速一分子観察し、Unbound 状態を(1)前方ステップ、(2)後ろ頭部の解離再結合、(3)前頭部の解離再結合、さらに(4)バックステップの 4 つに分類し、ネックリンカー伸長体では前頭部の解離頻度は低いものの後ろ頭部が解離したあとの再結合頻度が増加することを示した (図 1.13B,C)。この結果から、ネックリンカーにかかる張力は後ろ頭部が解離したあとの再結合を抑制する上で重要であることが示唆された。

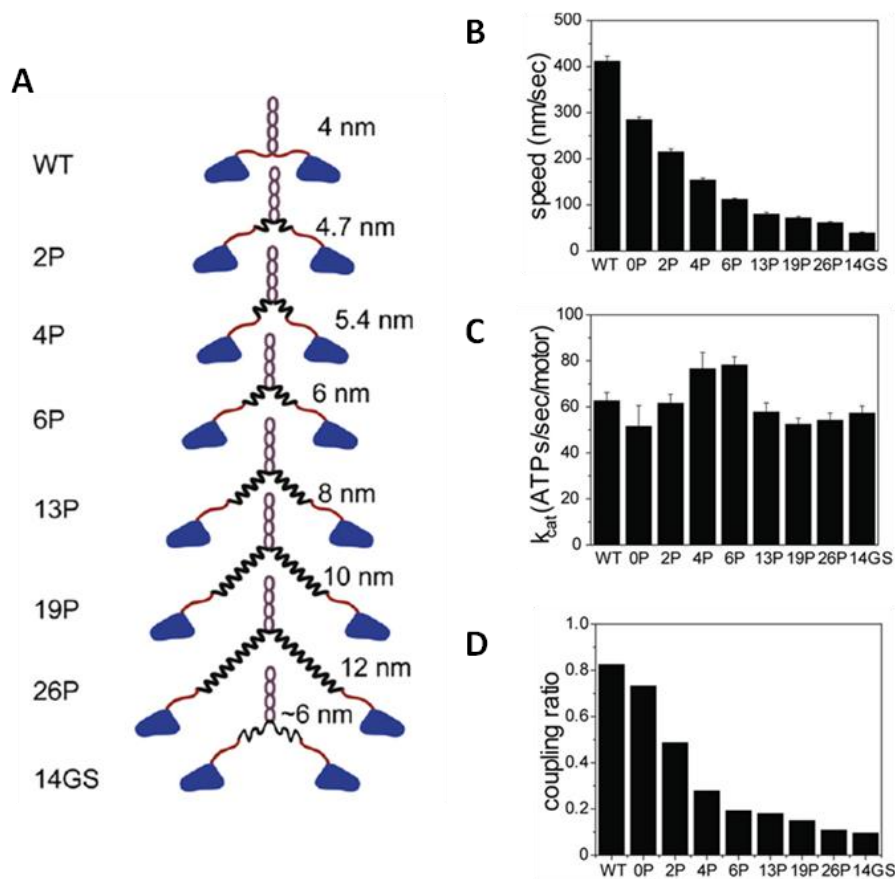


図 1.10 ネットリンカーを人工的に伸長した変異体の運動観察 ([Yildiz, 2008]より引用)

(A) キネシンのネットリンカーとコイルドコイルの間にポリプロリンもしくはポリグリシンセリンリンカーを導入し、ネットリンカーを伸長した。(B) 一分子での運動速度。リンカーが長いほど運動速度は低下した。(C) ATP加水分解速度はリンカー長によらず一定であった。(D) Coupling ratio は運動速度と ATP加水分解速度の比で与えられ、リンカーが長いほど低下した。

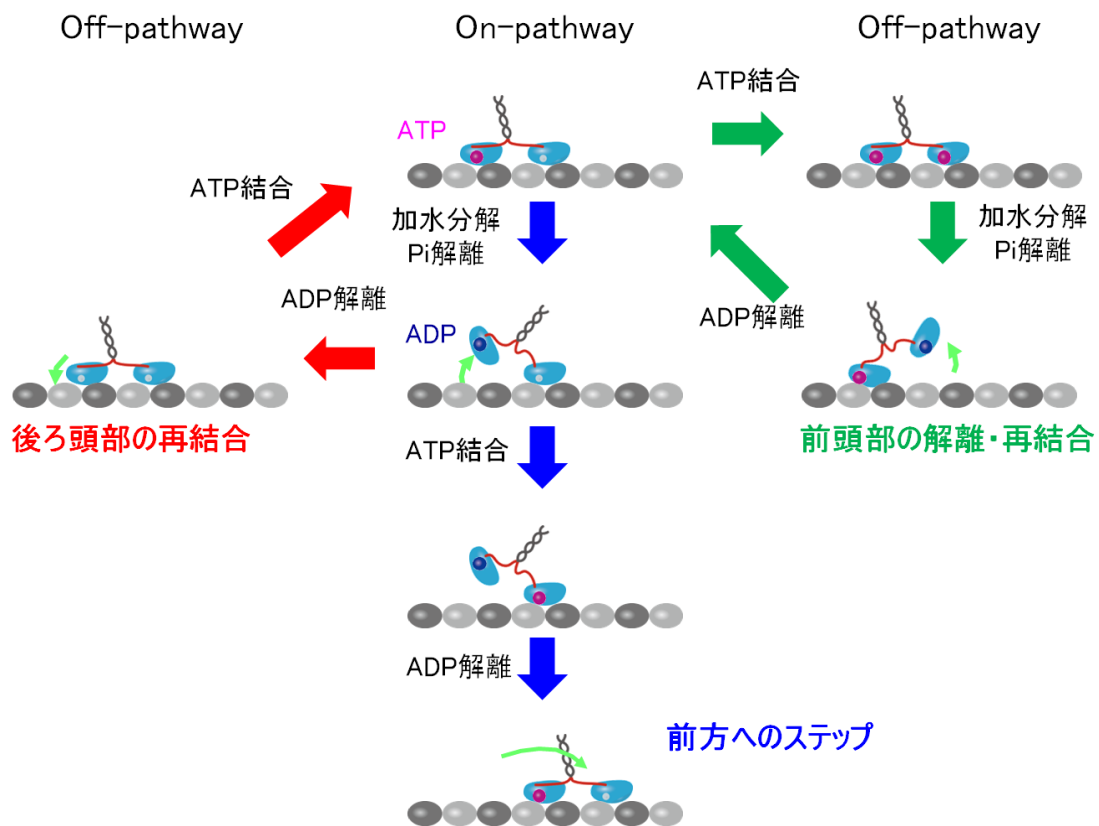


図 1.11 On-pathway の加水分解反応と Off-pathway の加水分解反応

On-pathway の加水分解反応では後ろ頭部が解離しその後 16 nm 前方の結合部位に結合するため、キネシンの重心位置は ATP 一分子あたり 8 nm 前方に移動する。Off-pathway の加水分解反応では後ろまたは前頭部が解離しその後元の結合部位に移動するため、キネシンの重心位置は変化しない。

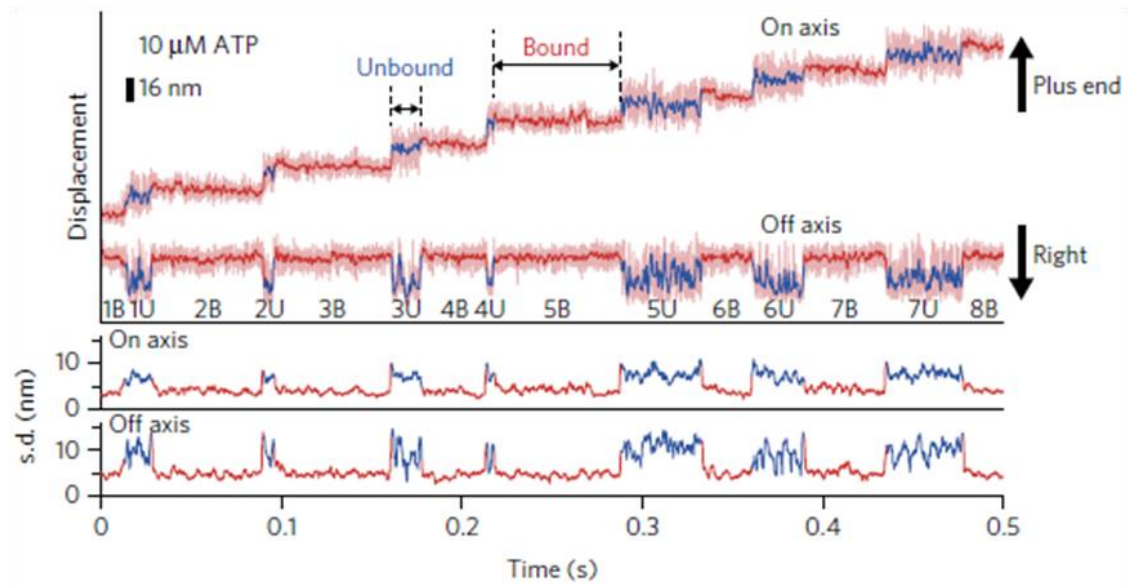


図 1.12 野生型キネシンの頭部に標識した金コロイド粒子の高速一分子観察 ([Isojima, 2016]より引用)

頭部に標識した金コロイド粒子の重心位置の $10 \mu\text{M}$ ATP 条件下における時間変化。On-axis は微小管プラス端方向、Off-axis はその垂直方向の変位を表す。S.D.は前後 20 フレームの標準偏差であり、16 nm ステップの直前に見られるゆらぎの大きな状態が Unbound 状態である。

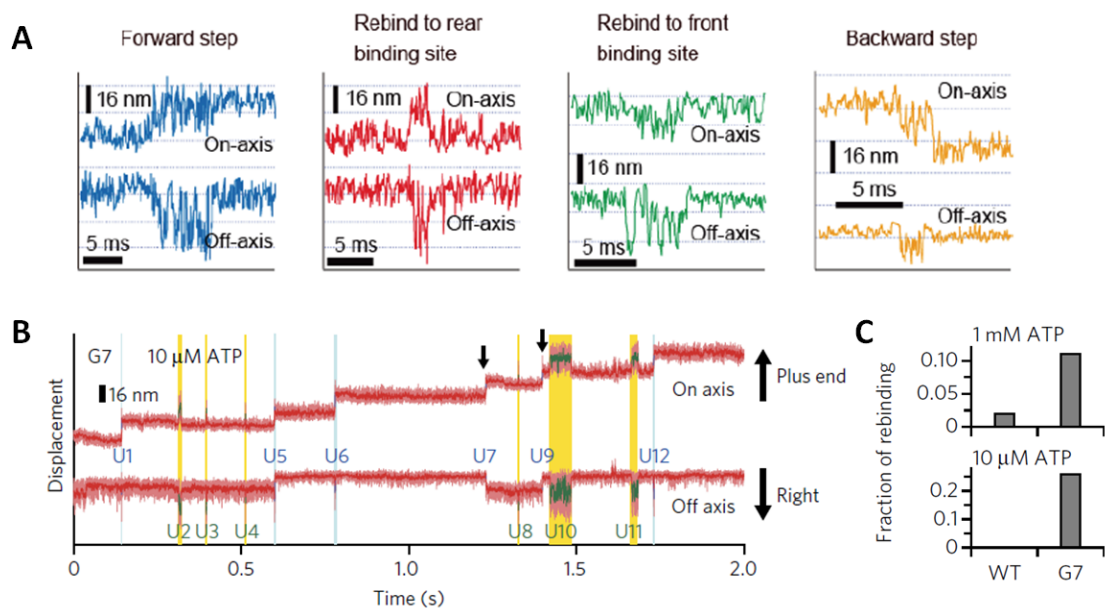


図 1.13 高速一分子観察による Off-pathway ステップの検出 ([Isojima, 2016]より引用)

(A) 全反射暗視野顕微鏡を用いた高速一分子観察により Unbound 状態を検出し、(1) 後ろ頭部が解離したあとの前方ステップ、(2) 後ろ頭部が解離したあとの再結合、(3) 前頭部が解離したあとの再結合、(4) 前頭部が解離したあとのバックステップに区別することができた。(B),(C) ネックリンカー伸長変異体 (G7) では後ろ頭部が解離したあと再結合する様子が頻繁に見られた。

1.5.1 前頭部の解離を抑制するメカニズム

両足結合状態で後ろ頭部が選択的に解離するためには、前頭部の解離が抑制されるか後ろ頭部の解離が促進される必要がある。前頭部と後ろ頭部ではネックリンカーにかかる張力は同じであり、違いはネックリンカーの向いている方向だけであるため、ネックリンカーの向きが頭部の解離の制御に重要であると考えられてきた。Ling らはネックリンカーと頭部の相互作用が加水分解反応の促進に重要であり、前頭部ではネックリンカーが後ろに引っ張られるために加水分解が阻害されているという仮説を立て、これを検証するためにネックリンカーを欠失させた単頭キネシンの加水分解速度を測定した [Ling, 2012]。その結果、ネックリンカーを C 末端側から欠失させていくと ATP 加水分解速度が低下し、325 番目のイソロイシン残基 (I325) を欠失させると加水分解活性がほとんど失われることを示した (図 1.14B)。I325 残基はネックリンカーが頭部にドッキングした状態では頭部の表面にできた疎水的ポケットと相補的に相互作用する [Vale, 2000] ことが知られているおり、この相互作用が加水分解の促進に重要であると考えられている。さらに Ling らは疎水的な I325 残基をより小さい疎水性残基や親水性残基に置換した変異体の加水分解速度を測定することで、疎水性残基の大きさが小さくなるほど ATP 加水分解速度が低下し、グリシンや親水性残基に置換した変異体では ATP 加水分解活性がほとんど失われることを明らかにした (図 1.14C)。このことから、ATP 加水分解反応の促進には疎水的な I325 残基が頭部の表面の疎水ポケットに挿入され、ネックリンカードッキングが安定化することが重要であることが示唆された。

X 線結晶構造解析によりキネシンの頭部は F ドメイン、R ドメイン、B ドメインに分けられることが明らかになり、ヌクレオチドフリー状態と ADP-Pi 状態の比較により、キネシン頭部の R ドメインは ATP 結合に伴い、微小管マイナス端方向から見て反時計回りに 25°程度回転することが明らかになった [Makino, 2010] [Cao, 2014] (図 1.15A)。Ling らは I325 残基をグリシンに置換した変異体 (I325G 変異体: 加水分解速度は野生型頭部の 1/30) の ATP 状態における構造を調べるために、AMP-PNP 存在下での I325G 変異体-微小管複合体の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて観察した。得られた画像を X 線結晶構造でフィッティングした結果、ATP (AMP-PNP) 状態の I325G 変異体ではネックリンカーがドッキングしておらず R ドメインは回転前の状態と回転後の状態の中間的な構造を取ることが明らかになった (図 1.15B,C)。この結果は、I325 残基は R

ドメインを回転後の状態で固定することで ATP 結合状態を安定化させるために重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

Niitani はネックリンカーの向きが ATP 加水分解サイクルの各ステップの反応速度に与える影響を調べるために、単頭キネシンのネックリンカーをシステインのジスルフィド結合を用いて頭部に固定し、ストップドフロー装置を用いて反応速度の測定を行った[Niitani, 2015] (図 1.16A)。その結果、ネックリンカーを後ろ向きに固定し前頭部の状態を模した単頭キネシンでは、ATP 結合速度に大きな変化はなかったものの、ATP が結合したあと加水分解しリン酸が放出されて微小管から解離するまでの一連の時間が、固定前の 20 倍程度長くなることを明らかにした (図 1.16B)。この結果はネックリンカーが後ろを向き、ネックリンカードッキングが阻害されている状態では、ATP 加水分解反応が抑制されることを裏付けるものである。一方ネックリンカーを前向きに固定し後ろ頭部の状態を模した単頭キネシンでは、ATP の可逆的解離速度が固定前の 1/30 程度に低下することが明らかになった (図 1.16B)。この結果はネックリンカードッキングにより ATP の結合状態が安定化するとするモデルを支持するものである。

また、ネックリンカーを伸長した変異体キネシンに光ピンセットによって負荷をかけ、測定された運動速度を運動モデルによってフィッティングした研究により、前頭部と後ろ頭部では ATP 結合速度は変わらないものの可逆的解離速度が前頭部で 5 倍程度高く、ATP 加水分解およびリン酸解離の速度が後ろ頭部で 8 倍程度高いことが示唆されている[Clancy, 2011]。この結果はネックリンカーを固定した単頭キネシンの反応速度を測定した Niitani の結果と矛盾しない。

これらの研究は両足結合状態の後ろ頭部では ATP の可逆的解離が抑制され、前頭部で ATP 加水分解反応が抑制されていることで後ろ頭部の選択的な解離が促進されていることを示唆している。しかしこれらは運動中の二量体キネシンの前頭部の解離を直接測定したものではなく、運動サイクル中に前頭部の解離速度がどの程度遅くなっているのかは明らかになっていない。

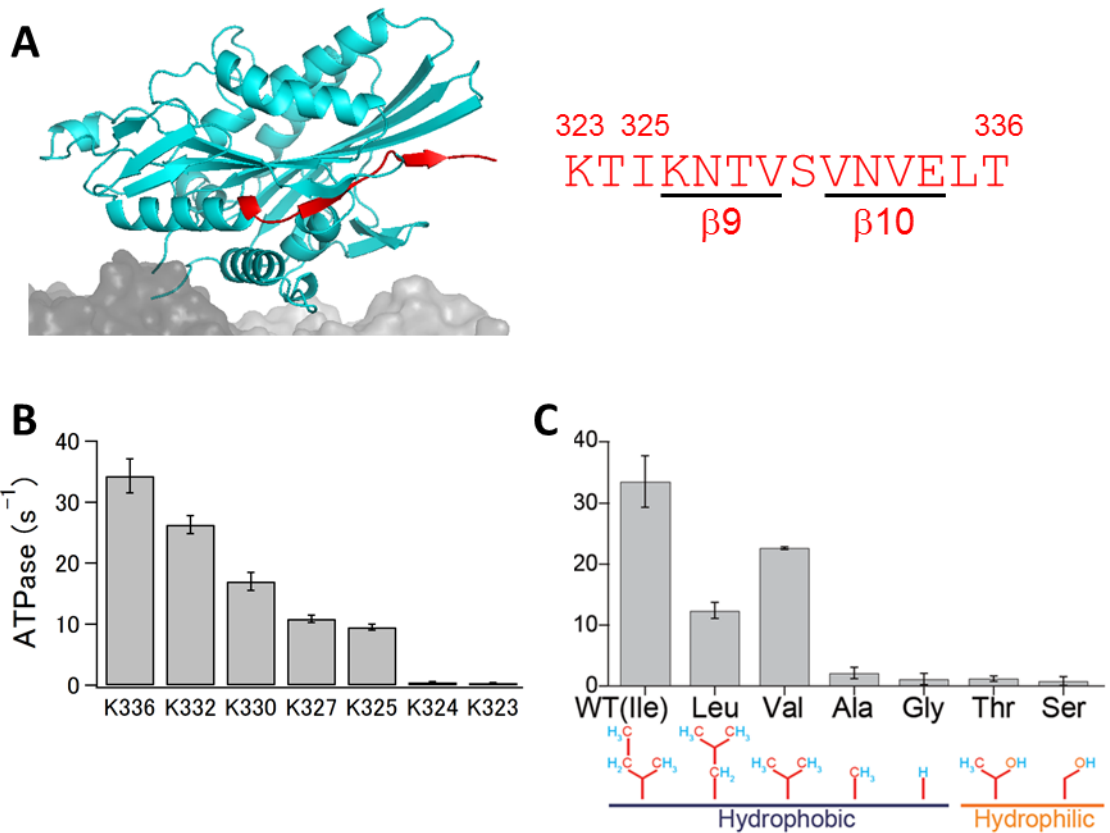


図 1.14 ネックリンカードッキングと ATP 加水分解反応速度の関係

(A) ネックリンカーのアミノ酸配列。(B) ネックリンカー欠損変異体の ATP 加水分解速度。数字はアミノ酸の長さを表し、例えば K336 はネックリンカーの 336 番目の残基までを含む単頭キネシンである。ネックリンカーを欠損させていくと加水分解速度が低下し、I325 を欠損させると加水分解活性がほとんど失われた。(C) I325 置換変異体の加水分解速度測定。I325 残基をイソロイシンよりも小さい疎水性残基や親水性残基に置換すると加水分解速度が低下した。(図は[Niitani, 2015]より引用)

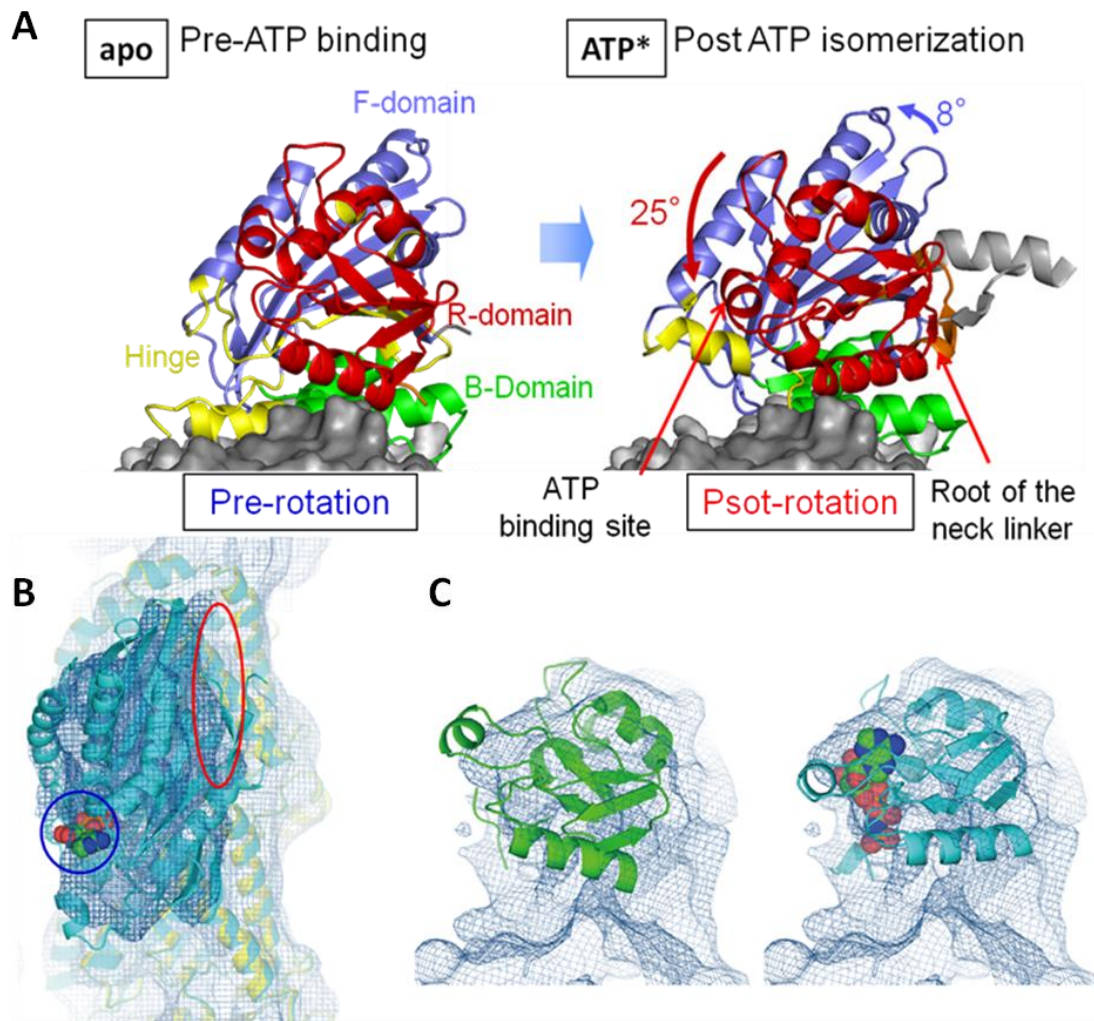


図 1.15 R ドメインの回転 ([Ling, 2012]より引用)

(A) ATP 結合前と結合後の頭部の微小管マイナス端方向から見た結晶構造。ATP が結合すると R ドメイン (赤) が反時計回りに 25° 程度回転する。(B) クライオ電子顕微鏡で得られた AMP-PNP 状態の I325G-微小管複合体の電子密度分布。ヌクレオチドポケットに AMP-PNP が結合しているが (青丸)、ネックリンカーはドッキングしていない (赤丸)。(C) I325G 変異体の電子密度分布に野生型キネシンの R ドメインの結晶構造をヌクレオチドフリー状態 (緑) と ATP 状態 (水色) のそれぞれでフィッティングしたもの。I325G 変異体の密度分布はどちらの構造とも一致せず、これらの中間的な構造を取ることが明らかになった。

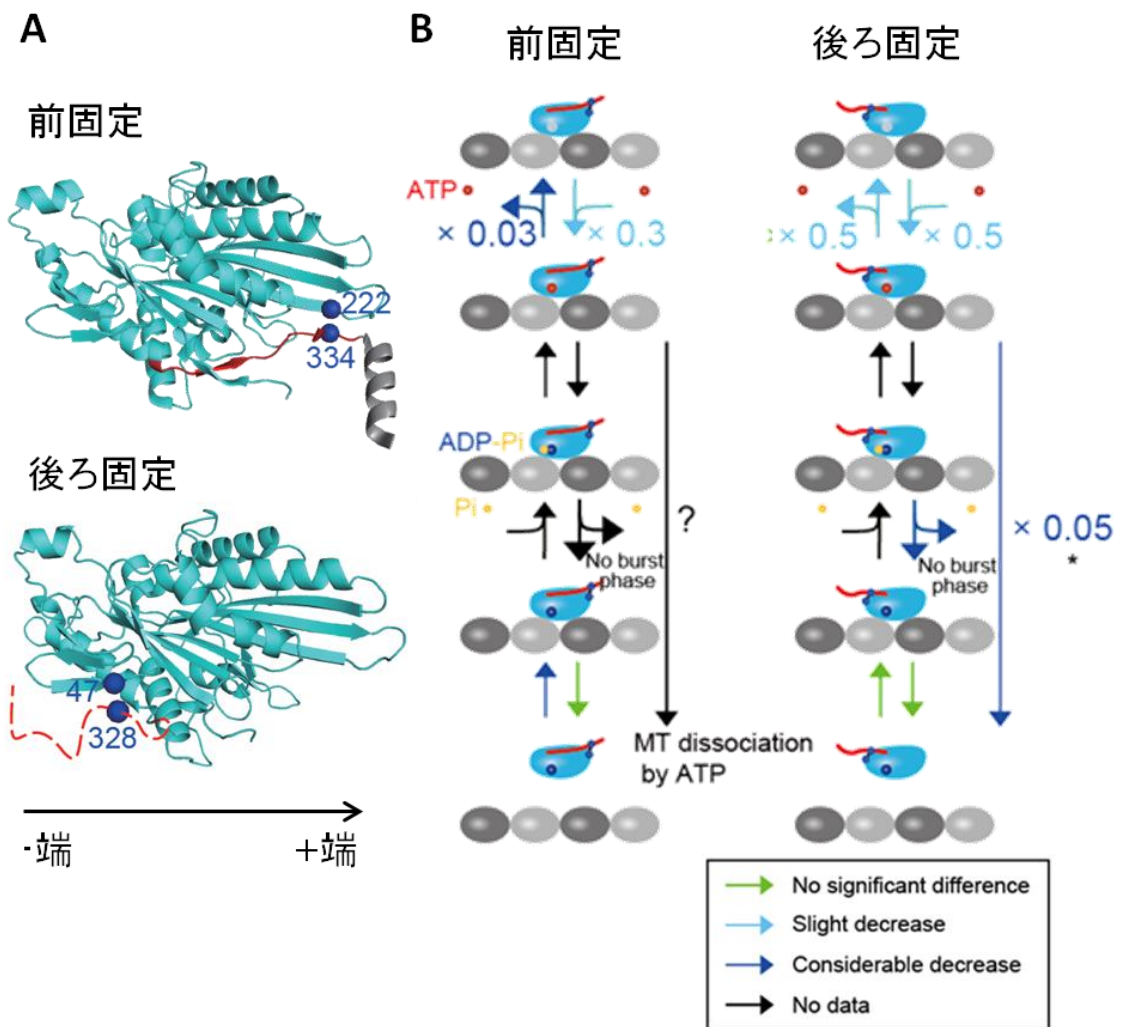


図 1.16 ネックリンカー固定変異体の反応速度測定 ([Niitani, 2015]より引用一部改変)
 (A)頭部とネックリンカーの特定の残基をシステインで置換し、酸化処理でジスルフィド結合を形成させることでネックリンカーを前向きまたは後ろ向きに固定した。(B)前固定体では ATP の可逆的解離速度が低下した。また、後ろ固定体では加水分解反応速度が低下した。

1.5.2 浮いた頭部が前方に選択的に結合するメカニズム

1.4 節で述べたように、Hand-over-hand でステップするキネシンは片足結合状態で微小管に結合した頭部への ATP 結合を待ち、その後浮いた頭部が 16 nm 前方の結合サイトに結合する。このとき微小管に結合した頭部への ATP 結合に伴うネックリンカードッキングが推進力となり浮いた頭部を前方へ移動させ、前方ステップを推進しているというモデルが立てられた[Rice, 1999] [Vale, 2000] (図 1.17)。このモデルはキネシンの前方ステップを説明するモデルとして広く受け入れられており、ネックリンカードッキングモデルと呼ばれる。しかし、ネックリンカードッキングモデルでは ATP 結合前の片足結合状態でも浮いた頭部の元いた位置への再結合が阻害されていて、ATP が結合するまでは片足結合状態を取り続けることを説明することができない。また、キネシン頭部の高速一分子観察により検出された頭部が解離した状態の分布の位置が ATP 濃度に依存しないことから、ネックリンカードッキングは浮いた頭部を前方に移動させないことが示唆されている[Isojima, 2016] (図 1.18)。したがって、キネシン二量体には片足結合状態で解離した頭部の後方の結合サイトへの結合だけを阻害し、前方の結合サイトへの結合は阻害しないメカニズムが存在することが示唆される。キネシンと同じ線型モーターの一種であるミオシン V は一歩 74 nm の Hand-over-hand の二足歩行を行うことが知られており[Yildiz, 2003]、後ろ頭部が解離した直後に解離した頭部のレバーアームのリカバリーストロークが起きることで、解離した頭部が後方の結合サイトには結合できず前方の結合サイトにのみ結合できる状態となることで再結合が抑制されていることが明らかになっている[Shiroguchi, 2011]。キネシンにおいても同じような制御機構があると考えられる。

最近我々の研究室でヌクレオチドフリー状態の結晶構造が明らかになったことで、ネックリンカードッキングに代わる前方ステップを説明する新たなモデルが提唱された[Makino, 2010]。浮いた頭部が元いた結合部位に再結合するためには後ろの結合サイトで ADP を解離しヌクレオチドフリー状態になる必要がある。ネックリンカーの付け根は R ドメインの微小管マイナス端方向から見て右下に位置しており、ヌクレオチドフリー状態では付け根の前方に $\alpha 4$ ヘリックスがある (図 1.19) ため後ろ頭部がヌクレオチドフリー状態の両足結合状態を取るためにはネックリンカーが立体障害を迂回し引き伸ばされた状態になる必要があるが、ネックリンカーは ADP 状態やヌクレオチドフリー状態でエントロピーばねとして振る舞うためこのときネックリンカーには張力が

かかる (図 1.20A)。また、微小管に結合した頭部に ATP が結合する前に浮いた頭部が前方にステップする場合もネックリンカーに張力がかかった状態を取る必要がある。一方、ATP 状態では R ドメインが微小管マイナス端方向から見て反時計回りに回転するためネックリンカーの付け根は $\alpha 4$ の上部に移動し、自由に前を向けるようになる。そのため ATP 結合後には浮いた頭部は強い張力を受けずに前方の結合サイトに移動することができ、またヌクレオチドフリー状態でもネックリンカーは自由に後ろ方向に向けるため ADP を解離してもネックリンカーに強い張力がかからない (図 1.20B)。このような張力の違いによって頭部の ADP 解離が制御されていると考えることで、頭部の選択的結合を説明することができる。これを **Biased binding** モデルと呼ぶ。

Biased binding モデルを用いることで ATP 結合前には浮いた頭部は前方にも後方にも結合することができず、ATP が結合すると前方へのステップだけが許されることを説明することができる。しかし、**Biased binding** モデルでは頭部の前方への移動はバイアスのない拡散運動のみで説明するため、前方へのステップを説明する上で **Biased binding** メカニズムだけでは不十分でありネックリンカードッキングによる拡散位置の移動が必要である可能性がある。しかし、キネシンの選択的前方ステップに **Biased binding** メカニズムとネックリンカードッキングメカニズムがそれぞれどれだけ重要であるかはよくわかっていない。

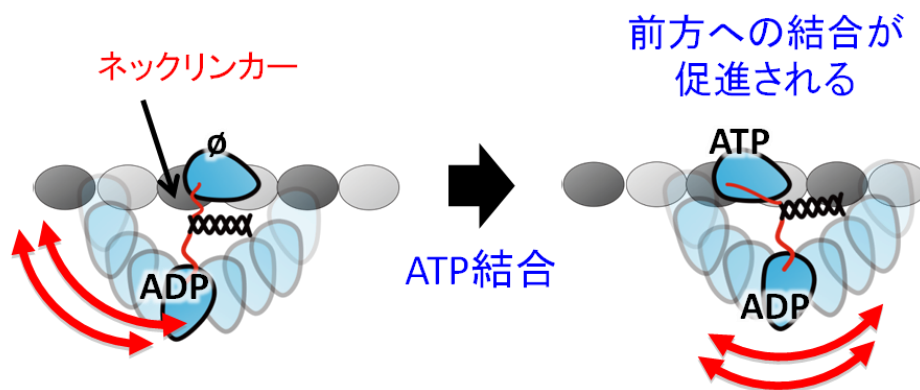


図 1.17 ネックリンカードッキングモデル

微小管に結合した頭部に微小管が結合するとネックリンカーがドッキングし、浮いた頭部の拡散運動が前方に移動する。そのため前方への結合が促進される。

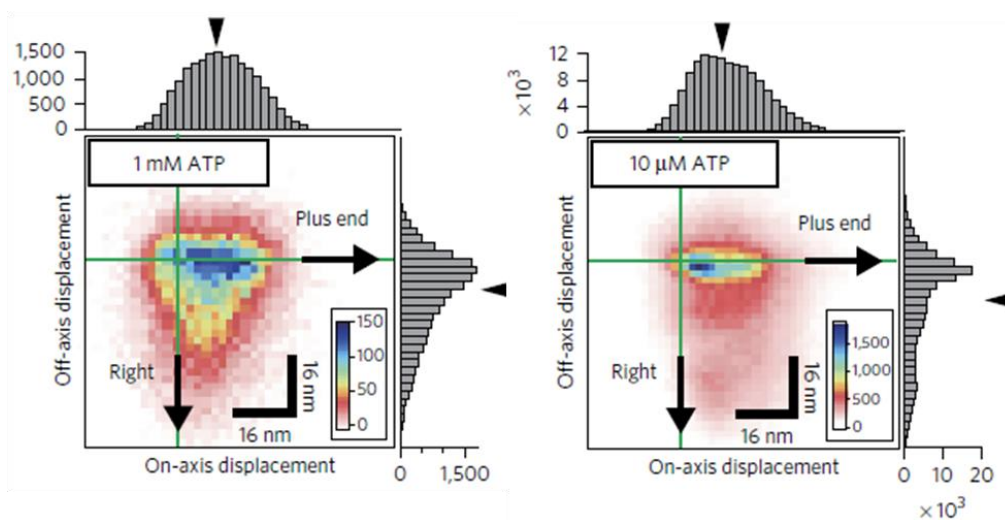


図 1.18 浮いた頭部の分布位置の ATP 濃度依存性 ([Isojima, 2016]より引用)

高速一分子観察によって観察された浮いた頭部の解離前の分布位置の中心を原点とした変位の分布。1 mM ATP 条件では ATP 結合後、10 μ M ATP 条件下では ATP 結合前の状態が支配的であると考えられるが、分布の平均や幅に違いは見られない。

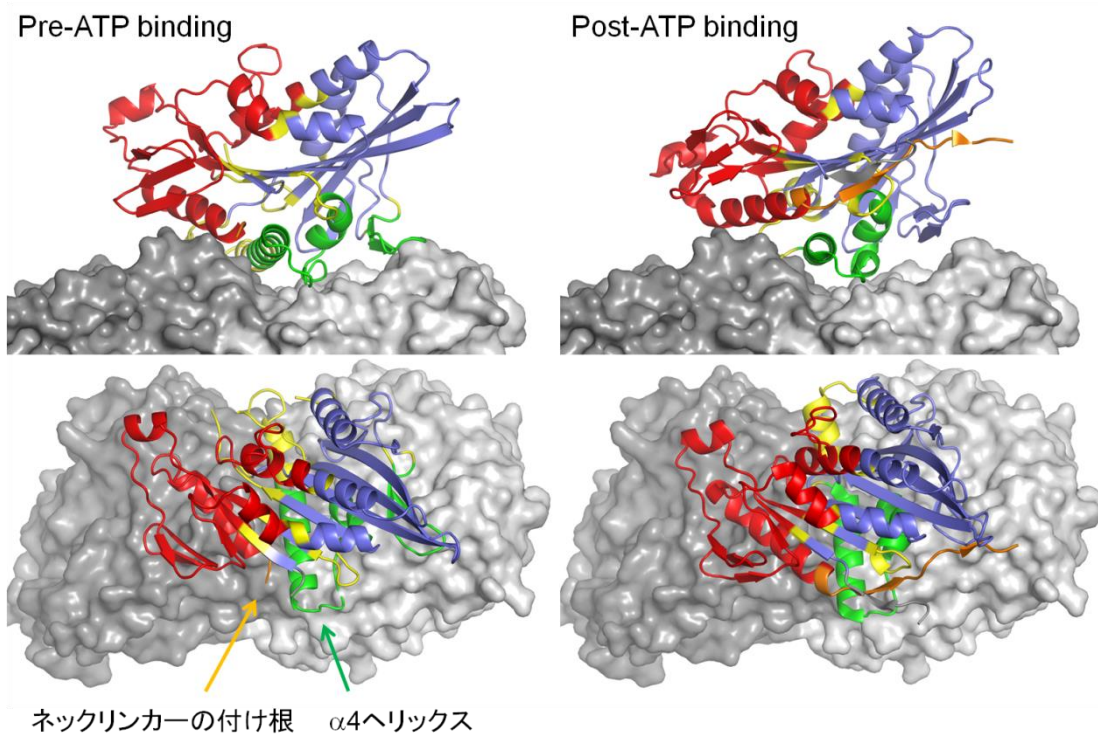


図 1.19 ネックリンカーの付け根と $\alpha 4$ ヘリックスの位置関係

(ATP 結合前) ネックリンカーの付け根 (橙) は B サブドメイン (緑) の $\alpha 4$ ヘリックスの後方に位置している。(ATP 結合後) R ドメイン (赤) の回転に伴いネックリンカーの付け根の位置が $\alpha 4$ ヘリックスの上方に移動する。

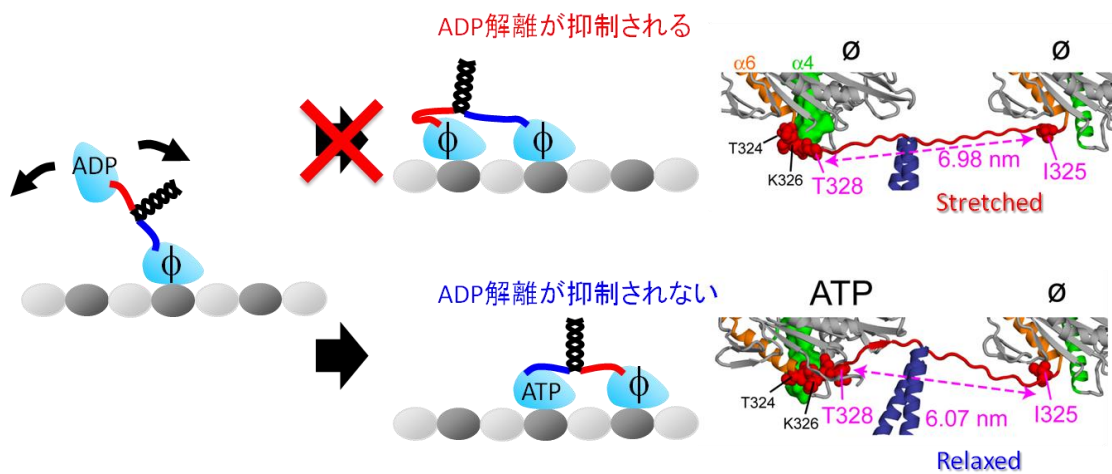


図 1.20 Biased binding モデル

後ろ頭部がヌクレオチドフリーの両足結合状態では後ろ頭部の $\alpha 4$ ヘリックスが立体障害となりネックリンカーが引き伸ばされた形になるため、ネックリンカーに強い張力がかかる。一方後ろ頭部が ATP 状態の両足結合状態では後ろ頭部の $\alpha 4$ ヘリックスは立体障害とならないためネックリンカーは引き伸ばされず、ネックリンカーの張力は比較的低い状態になる。

1.6 研究の目的と方法

キネシンが ATP を無駄に消費することなく、加水分解エネルギーを効率よく運動に変換するためには、前頭部の解離の抑制、浮いた後ろ頭部の選択的前方ステップ、そして ATP 加水分解後の弱結合状態の頭部における ADP 解離の抑制、この 3 つの制御が必要である。本研究では、以下の 3 つの実験をすることでこれらの制御の仕組みを明らかにすることで、キネシンの効率的な二足歩行の仕組みを明らかにすることを試みた。

実験 1: 両足結合状態の前頭部の解離速度の定量的測定

1.5.1 で述べたように、先行研究から ATP 加水分解にはネックリンカーと頭部の相互作用が不可欠であり、前頭部ではネックリンカーが後ろを向いているために加水分解が抑制され微小管からの解離が抑制されていることが示唆されているが、前頭部の解離速度がどの程度遅くなっているのかは明らかになっていない。

そこで本研究では二量体のキネシンを用いて前頭部の解離速度を実際に測定することにした。野生型の二量体では前頭部が解離する前に後ろ頭部が解離してしまうため本研究では一方の頭部に変位を導入した変異体ヘテロダイマーを用いた。キネシン頭部の E236 残基はヌクレオチド結合部位付近にあり、この残基をアラニンに置換した E236A 変異体は ATP 加水分解速度が非常に遅く (0.04 s^{-1} 以下)、ネックリンカードッキング状態を長い時間とり続けることが知られている[Rice, 1999]。一分子 FRET 計測により E236A 変異体頭部と野生型頭部のヘテロダイマー (E236A ヘテロダイマー) は ATP 条件下で E236A 変異体頭部が後方にあり野生型頭部が前方にある両足結合状態が支配的であることがわかっている (図 1.21[Niitani, 2015]) ため、E236A ヘテロダイマーの野生型頭部を観察することで二量体キネシンの前頭部の解離を観察できると考えられる。本研究では E236A ヘテロダイマーの野生型頭部を金コロイド粒子で標識し全反射型暗視野顕微鏡を用いて運動を観察することで前頭部の解離速度を定量的に測定した。

実験 2: 浮いた頭部の選択的前方ステップを説明する 2 つのモデルの検証

1.5.2 で述べたように浮いた頭部の選択的前方ステップを説明するモデルとしてネックリンカードッキングモデルと Biased binding モデルの 2 つのモデルが提唱されているが、選択的前方ステップにそれぞれのモデルがどれだけ重要であるのか明らかになっていない。これら 2 つのモデルがキネシン頭部の選択的前方ステップにおいて重要な役

割を果たしているのか明らかにするためには、それぞれのモデルが唱えるメカニズムが単独で選択的前方ステップを引き起こすことができるか否かを確認すればよい(以後対比をわかりやすくするため、ネックリンカードッキングモデルを **Biased diffusion** モデルと呼び、それぞれのモデルが唱えるメカニズムをそれぞれ **Biased diffusion** メカニズム、**Biased binding** メカニズムと呼ぶ)。**Biased diffusion** メカニズムでは片足結合状態で微小管に結合している頭部のネックリンカードッキングが重要であり、一方の **Biased binding** メカニズムでは浮いた頭部が微小管上の結合サイトに弱結合し ADP を解離する際にネックリンカーが頭部の立体障害によって引き延ばされることを原理としているため浮いた頭部のネックリンカーが重要であるが、野生型の二量体キネシンでは 2 つのネックリンカーは対称であるためそれぞれの役割を区別することはできない。

そこで本研究では 2 つの頭部をアミノ酸配列上でタンデムに繋いだ変異体のキネシン(タンデムキネシン)を用いることにした(図 1.22A)。タンデムキネシンでは N 末端側の頭部(N-head と呼ぶ)のネックリンカーと C 末端側の頭部(C-head と呼ぶ)の N 末端領域がつながっているため、N-head だけが微小管に結合した片足結合状態では C-head はネックリンカードッキングの影響を受け、微小管上の結合サイトで ADP を解離するときネックリンカーは張力を受けない。従ってこのとき C-head は **Biased diffusion** メカニズムのみによってステップすると考えられる。一方 C-head だけが微小管に結合した片足結合状態では N 末端に繋がった N-head は C-head のネックリンカードッキングの影響を受けず、ネックリンカーは前後の結合サイトで異なる張力を受け ADP 解離が制御されると考えられる。従ってこのとき N-head は **Biased binding** メカニズムのみによってステップすると考えられる。蛍光一分子観察によりタンデムキネシンは微小管上をプロセスに運動することが明らかになっている[Isojima, 2013]ため、タンデムキネシンは **Biased diffusion** メカニズムのみによるステップと **Biased binding** メカニズムのみによるステップを交互に用いて運動すると考えられる(図 1.22B)。本研究ではタンデムキネシンのそれぞれの頭部を金コロイド粒子で標識し、その運動を全反射暗視野顕微鏡で観察し、それぞれのステップで浮いた頭部が後方に再結合する確率やステップにかかる時間を測定することで、**Biased diffusion** メカニズムと **Biased binding** メカニズムがそれぞれの程度効率的に選択的前方ステップを引き起こしているか明らかにすることを目指した。

実験 3: 頭部の ADP 解離を制御する仕組みの検証

1.2 で述べたように ATP を加水分解しリン酸を解離した頭部は ADP を解離せずに微小管から解離し、再び微小管に弱結合すると ADP を解離し強結合状態になることから、微小管からの解離直後と微小管への結合直前では頭部の状態が異なっており、ADP 解離が異なる制御を受けることが示唆される。したがって、微小管から解離した頭部は何らかの構造変化の後に微小管に結合することが示唆される。また、二量体のキネシンの頭部の運動を高速一分子観察した研究により、片足結合状態の ATP 非依存的過程の持続時間は 2.3 ms 程度と拡散運動がエネルギー障壁を越える First passage time (数 μs) よりも長く、そのことから何らかの構造変化の存在が示唆されている [Isojima, 2016]。しかし、二量体ではどちらの頭部の構造変化が律速となっているかわからず、微小管に結合した頭部のネックリンカードッキングが律速となっている可能性が否定できないためこの結果を浮いた頭部の構造変化が起きる根拠とすることはできない。

そこで本研究では単頭のキネシンを金コロイド粒子で標識し全反射型暗視野顕微鏡を用いて高速一分子観察することで浮いた頭部が再び微小管に結合するまでの時間を測定することにした。しかし、単頭をそのまま観察した場合解離した頭部を追跡することができないため、微小管から解離した頭部が再び微小管に結合するまでの時間を測定することはできない。そこで本研究ではキネシンの頭部およびネックリンカーをコイルドコイルを介して E236A 変異体頭部に接続した変異体(アンカーモノマー; 図 1.23A) を用いた。アンカーモノマーを用いることで単頭キネシンを微小管上に係留することができ、野生型頭部は E236A 変異体頭部周辺の結合サイトへの結合を繰り返す [Matsuzaki, 2013] (図 1.23B) ため、野生型頭部の運動を高速一分子観察することで同一の頭部が微小管から解離してから再び結合するまでの時間を繰り返し計測することができると考えられる。

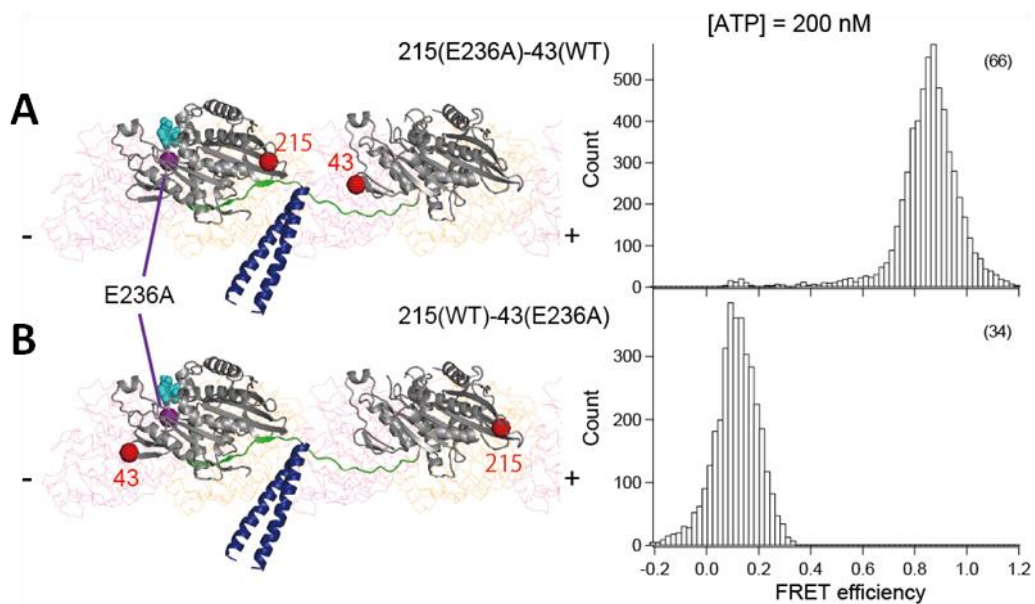


図 1.21 E236A ヘテロダイマーは ATP 条件下で野生型頭部が前頭部の両足結合状態を支配的にとる ([Niitani, 2015]より引用)

E236A ヘテロダイマーのそれぞれの頭部の 43 番残基と 215 番残基を cy3,cy5 で標識し、FRET 効率を測定した。(A)野生型頭部の 43 番残基と E236A 頭部の 215 番残基を蛍光標識した結果。FRET 効率のピークは 88 %。(B) 野生型頭部の 215 番残基と E236A 頭部の 43 番残基を蛍光標識した結果。FRET 効率のピークは 8 %。

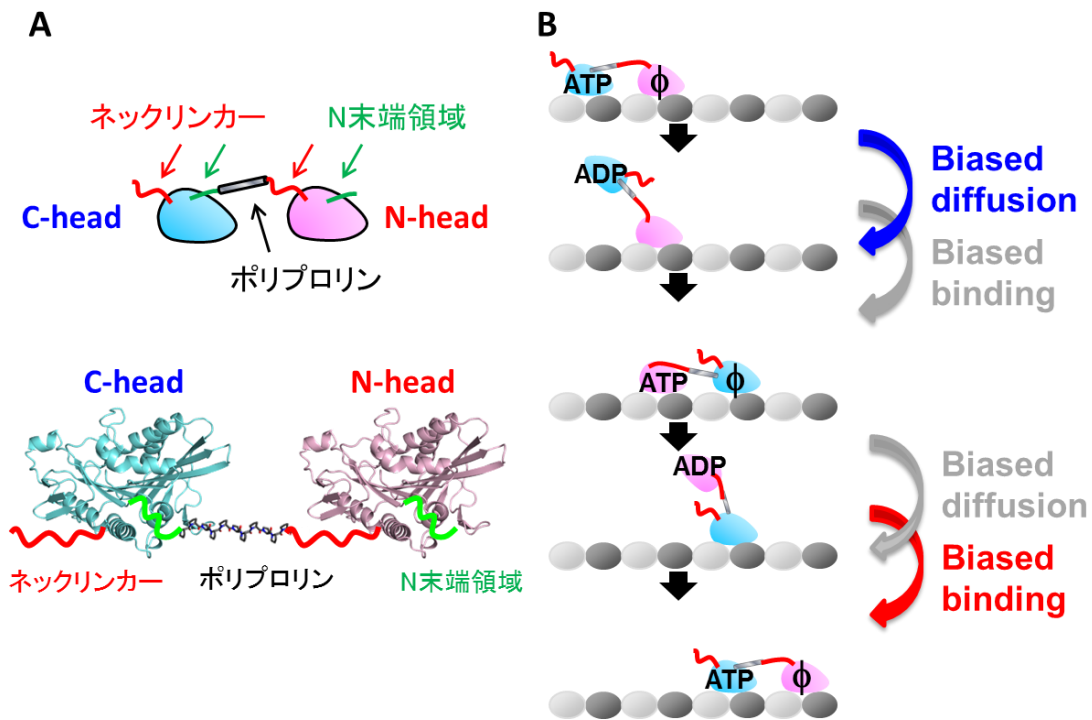


図 1.22 タンデムキネシン

(A)タンデムキネシンの構造の模式図 (right-view)。N-head (マゼンダ) のネックリンカー (赤) と C-head (シアン) の N 末端領域 (緑) がアミノ酸配列上で繋がっている。2 頭部間にはリンカー長の調節のためポリプロリンが挿入されている。(B)タンデムキネシンの運動サイクル。C-head がステップするときは Biased diffusion メカニズムだけが機能し N-head がステップするときは Biased binding メカニズムだけが機能すると考えられる。

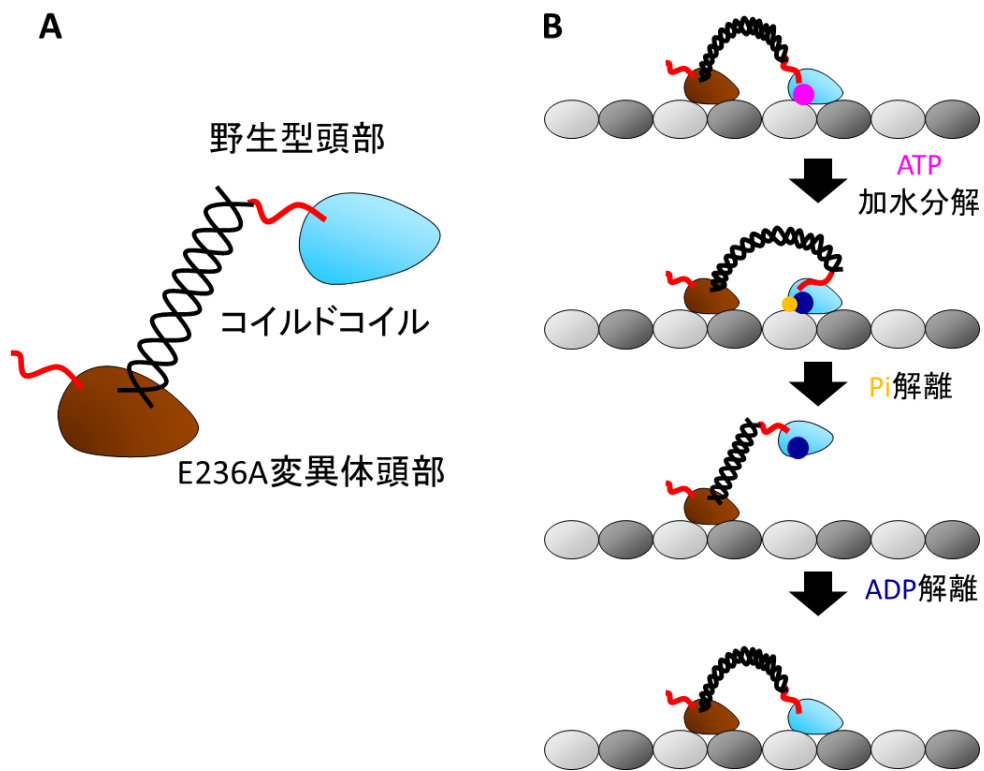


図 1.23 アンカーモノマー

(A)アンカーモノマーの構造図。野生型頭部のコイルドコイルと E236A の N 末端に接続したコイルドコイルが二量体化した構造をしている。(B)アンカーモノマーの運動スキーム。ATP 加水分解と共役し E236A 変異体頭部周辺の結合部位への結合と解離を繰り返す。

1.7 本論文の構成

第1章では研究の背景を紹介し、研究の目的を述べた。

第2章では実験に用いた試料の作成方法および実験方法を述べる。

第3章では E236A ヘテロダイマーの高速一分子観察の結果について述べる。

第4章ではタンデムキネシンの高速一分子観察の結果について述べる。

第5章ではアンカーモノマーの高速一分子観察の結果について述べる。

第6章では研究全体をまとめおよび考察について述べた。

第 2 章 実験手法

2.1 試料の作成

2.1.1 本研究で用いたキネシン変異体

本研究で用いた変異体は全て全長 336 アミノ酸または 490 アミノ酸のキネシン”cys-light “変異体 (K336CLM,K490CLM) をベースに作成された。Cys-light 変異体はキネシンの表面に露出したシステイン残基を全てアラニンないしセリンに置換した変異体であり[Rice, 1999]、この変異の導入によるキネシンの活性への影響はほとんどないことが知られている[Tomishige, 2000]。単量体で用いる変異体は C 末端に His⁶ タグを持ち、二量体で用いる変異体では一方のアミノ酸配列は C 末端に Strep タグを持ちもう一方は C 末端側に His⁶ タグを持つ。

二量体キネシン

ヘテロダイマーキネシンは His⁶ タグ、Strep タグを C 末端を持つ 2 つのポリペプチド鎖を二量体化することで形成される (図 2.1 上段)。

タンデムキネシン

タンデムキネシンは 2 つの K336CLM (N-head, C-head と呼ぶ) の C 末端と N 末端を 11 アミノ酸ないし 15 アミノ酸のポリプロリンを介してアミノ酸配列上で直接つなぐことで作られた単量体である (図 2.1 中段)。ポリプロリンは polyproline helix II と呼ばれる比較的硬い特有のヘリックス構造をとることが知られている [Schimmel, 1967]。2 頭部間に回転自由度を持たせるためにポリプロリンと N-head との間にグリシンを 1 残基導入した。

頭部に金コロイド粒子を標識するための変異体では N-head または C-head の 55 番目のアミノ酸残基をシステインに置換した。またリンカーを標識するための変異体では 11 アミノ酸のポリプロリンリンカーの 6 番目のプロリンをシステインに置換した。

アンカーモノマー

アンカーモノマーは 2 種類のポリペプチド鎖からなるヘテロ二量体である。一方のポ

リペプチド鎖は 55 番目のアミノ酸をシステインに置換した K490CLM であり、もう一方の変異体は K490CLM のストーク部位 (337-490) の C 末端に E236 変異を持つ K336CLM をつないだ構造をしている (図 2.1 下段)。これら 2 つのポリペプチド鎖を大腸菌内で共発現させることでコイルドコイルの N 末端側と C 末端側にそれぞれ頭部を一つ持つヘテロ二量体が形成される。

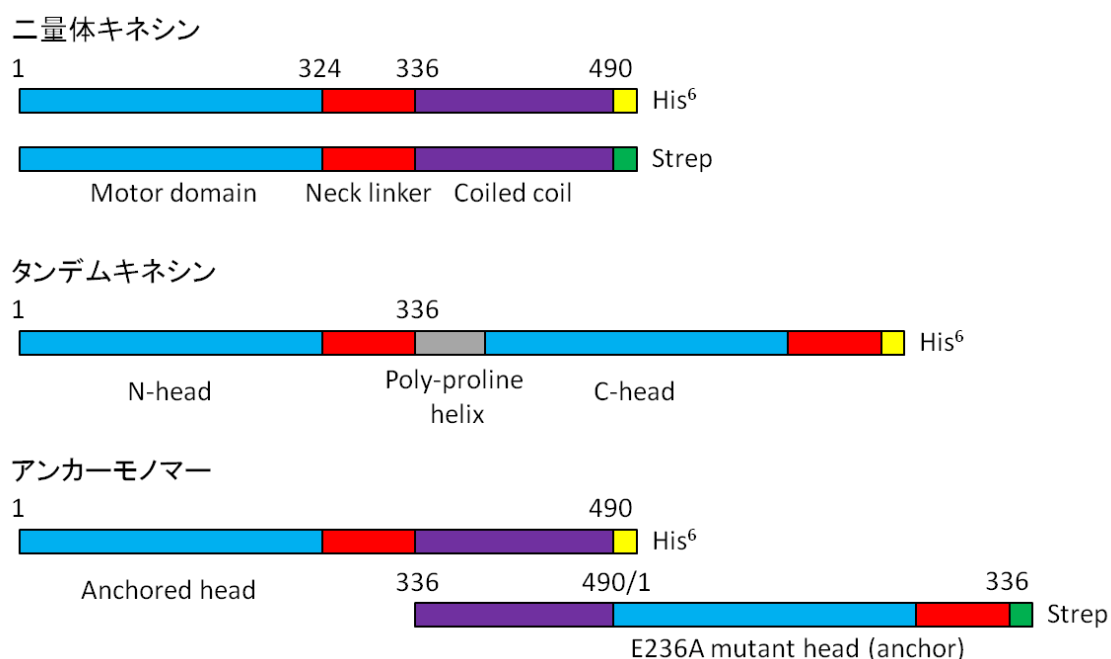


図 2.1 本研究で用いたキネシン変異体のアミノ酸配列

(上段) K490CLM は頭部 (シアン)、ネックリンカー (赤) およびコイルドコイル (紫) を含み、コイルドコイルで二量体化する。(中段) 頭部とネックリンカーを含む 2 つの K336CLM をポリプロリン (灰色) を介してアミノ酸配列上につなげることでタンデムキネシンを作成した。(下段) アンカーモノマーは K490CLM と、コイルドコイルの C 末端側に E236A 変異を導入した頭部をつなげたポリペプチド鎖を二量体化することで作成した。

2.1.2 キネシンの発現および精製

PCR クローニング法を用いてキネシン変異体の DNA 配列を作成し、プラスミドに組み込んだ。全ての配列は DNA シークエンシングにより確認された。また、プラスミドにはキネシンの DNA 配列に加えてアンピシリン耐性遺伝子を組み込んである。

タンパク質の発現および精製は[Isojima, 2016]に従った。まず目的の DNA 配列を組み込んだプラスミドをコンピテントセル (C600003; Invitrogen) に混ぜ、氷上 10 分反応させることでプラスミドを大腸菌に組み込んだ。寒天培地に大腸菌を撒き、37°Cで一晩培養することでコロニーを形成させた。コロニーを液体培地に移し、37°Cで 7 時間振盪培養することでさらに大腸菌を増殖させた。その後 IPTG を加え、22°Cで一晩振盪培養することで目的のタンパク質の発現を促した。

大腸菌が入った液体培地を遠心 (8,100×g, 20 分) によって分離し、沈殿を超音波破碎することで大腸菌の細胞壁を破壊した。破碎液を遠心 (40,800×g, 45 分) によって分離し、タンパク質が含まれる上清を回収した。上清を Ni-NTA アガロース (30210; QIAGEN) を用いてアフィニティー精製することで His⁶ タグを持つタンパクだけを精製した。

ヘテロ二量体で用いる変異体の場合には、さらに Strep-Tactin アフィニティー精製 [Tomishige, 2006]を行った。N-NTA アガロース精製後のサンプルを Strep-Tactin Sepharose (IBA) カラムに流し、ST buffer (50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 250 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoethanol, 100 μM ATP) を流して洗浄した。カラムに 2.5 mM d-desthiobiotin を含む ST buffer を流すことで Strep タグを持つタンパクだけを溶出させた。

精製後のタンパク質を 12 mM PIPES (pH 6.8), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 μM ATP の条件で 4°C, 3 時間透析した。

2.1.3 キネシンへの金コロイド粒子の標識

キネシン頭部へのアビジン修飾

透析後のキネシンにビオチン/キネシン比が 40-100 倍になるように biotin-PEG2-maleimide (21901; Thermo Fisher Scientific) を混ぜ、室温で 10 分間反応させた。未反応の biotin-PEG2-maleimide を不活性化させるためにジチオトレイトール (DTT; 最終濃度 10 mM) を混ぜ室温で 15 分反応させた。ビオチン化したキネシンに微小管 (豚脳から精製 [Woehlke, 1997] したチューブリンを重合 [Isojima, 2016] したもの)、AMP-PNP (Adenylyl-imidodiphosphate (A2647; Sigma); 最終濃度 1 mM)、taxol (Paclitaxel (T1912; Sigma); 最終濃度 50 μM) を混ぜ室温で 12 分間反応させ、遠心 (230,000 g, 10 分) によって未反応のビオチンを分離した。

上清を取り除き沈殿を wash buffer (12 mM PIPES (pH 6.8), 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 μM taxol) で洗い、Streptavidin (192-17864; Wako) をアビジン/ビオチン比が 25 になるように溶かした wash buffer で沈殿を溶かし室温 20 分で反応させた。遠心 (230,000×g, 10 分) によって未反応のアビジンを分離し、wash buffer で洗浄した沈殿を release buffer (12 mM PIPES (pH 6.8), 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 μM taxol, 100 μM ATP, 1 mM DTT) で溶かし、室温で 3 分間反応させキネシンを微小管から解離させた。最後に遠心 (230,000×g, 5 分) によって微小管を分離し、アビジン修飾されたキネシンを得た。

金コロイド粒子の調整

直径 40 nm の金コロイド粒子 (9.00×10¹⁰ particles/ml; EM.GC40; Boston Biomedical) 1.6 ml に 0.3 % (w/v) の Tween 20 を含む 10 mM リン酸バッファー (pH 8.0) 1.8 ml を混ぜた。100 μl のエタノールに 40 μg biotinolated AlkanePEG Thiol (SPT-0012D; SensoPath Technologies) , 2 μl carboxy- EG6-undecanethiol (C445-12; Dojindo Laboratories) , 2 μl hydroxy-EG6- undecanethiol (C355-12; Dojindo Laboratories) を溶かしてよく混ぜたあと、混合液を金コロイド粒子と混ぜて 70°C で一晩反応させた。未反応のチオール基を遠心 (20,000×g, 5 分, 5 回) で取り除き、5 μM のホウ酸バッファーで 10 μl に合わせた。

キネシンと金コロイド粒子の反応

観察前にアビジン修飾キネシンを希釈し、ビオチン修飾金コロイドと 1/1 で混ぜ合わせ、氷上で 15 分反応させた。

2.1.4 観察用微小管の重合

豚脳から精製した 5 mg/ml のチューブリンに 1 mM GTP, 5 mM MgCl₂, 10% (v/v) DMSO (Dimethyl sulfoxid) を加え 37°C で 30 分反応させた。続いて 2 倍量の BRB80 バッファー (80 mM PIPES (pH 6.8), 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) に 1 mM GTP, 40 μM taxol を加えたものを混ぜ、室温で 20 分間重合させた。反応液を遠心 (40,000 g, 5 分) して微小管を分離し、沈殿を 20 μM taxol を加えた BRB80 で溶かすことで微小管溶液を得た。

2.2 顕微鏡観察

2.2.1 観察用フローセルの作成

フローセルはスライドガラスとカバーガラス (24 mm × 36 mm and 18 mm × 18 mm; Matsunami Glass Ind.) を 2 本のスペーサー (厚さ 50 μm 程度) で重ね合わせることで作成した (図 2.2)。スライドガラスは自家蛍光を抑えるためにあらかじめ 0.1 M KCl で洗浄した。まず 1 mg/ml の protein A (P6031-1MG; Sigma-Aldrich) を含む BRB12 バッファー (12 mM PIPES (pH 6.8), 2 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA) をフローセルに 10 μl 流し 2 分間放置した。続いて BRB12 を 40 μl 流して余剰の protein A を取り除き、50 $\mu\text{g/ml}$ の anti- α -tubulin (T6199; Sigma) を含む BRB12 を 10 μl 流し 5 分間放置した。続いて 20 μM taxol を含む BRB12 (B12T) を 40 μl 流して余剰の anti- α -tubulin を取り除き、微小管を含む B12T を 20 μl 流し 2 分間放置した。続いて 1 mg/ml の casein (C5890; Sigma) を含む B12T を 40 μl 流し 2 分間放置した。続いてキネシン-金コロイド混合液 1.5 μl と B12T 6.5 μl を混ぜた溶液を流し 5 分間放置した。最後に B12T を 60 μl 流して余剰の金コロイドを取り除き、観察用バッファー (任意の濃度のヌクレオチド, 20 mM KCl, 70 mM β -mercaptoethanol, 10 $\mu\text{g/ml}$ creatine kinase, 2 mM creatine-phosphate を含む B12T) を 40 μl 流し、マニキュアで隙間を塞いだ。全ての行程は室温で行われた。

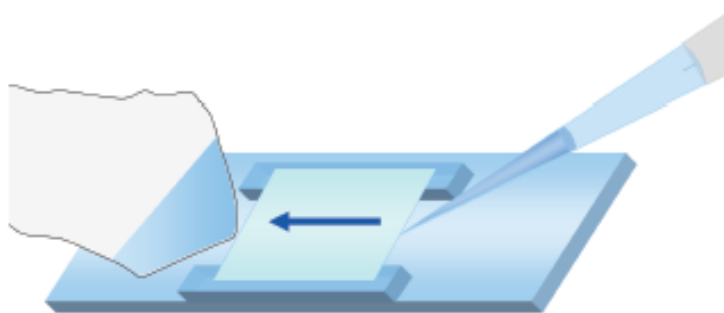


図 2.2 フローセルの模式図 ([Isojima, 2013]より引用)

スペーサーによってできた空隙にピペットマンで溶液を注入し、反対側から紙で溶液を吸い上げることでフローセル内に溶液を流す。

2.2.2 全反射暗視野顕微鏡による観察

対物型の全反射照明暗視野顕微鏡（図 2.3 [Ueno, 2010]）を用いて金コロイド粒子の散乱光を観察した。レーザー光を楕円形の非反射面（短軸:7.0 mm, 長軸:9.9 mm）を持つ穴あきミラーで反射させて対物レンズ（PlanApo N 60×NA = 1.45, oil; Olympus）に入射した。穴あきミラーの非反射面を通った散乱光を高速 CMOS カメラ（FASTCAM-1024PCI または FASTCAM Mini AX100; Photron）を用いて撮影し、8 ビット AVI 形式で保存した。フレームレートは FASTCAM-1024PCI では 18,000 fps、FASTCAM Mini AX100 では 20,000 fps である。

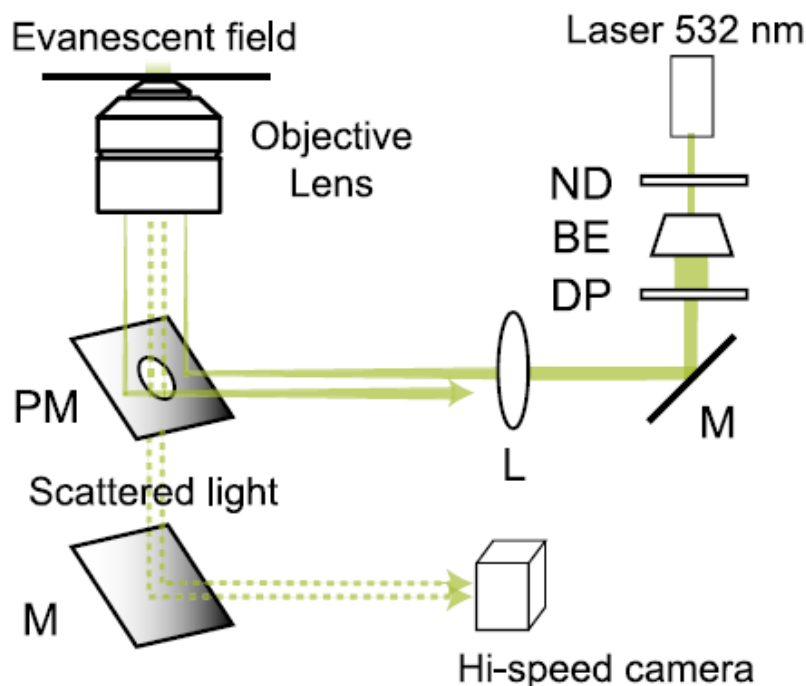


図 2.3 全反射暗視野顕微鏡 ([Ueno, 2010]より引用)

レーザー光を穴あきミラー（PM）で反射させ対物レンズに入射させる。穴あきミラーの非反射面を通った散乱光を高速カメラを用いて撮影した。

2.2.3 データの解析

暗視野画像の輝度分布を二次元ガウス関数でフィッティングし輝点の中心位置を 1.3 nm の位置決定精度で得た [Isojima, 2016]。一方向的に運動する変異体の場合には軌跡を直線でフィッティングすることで進行方向を決定し、進行方向を On-axis (X 軸)、その垂直方向を Off-axis (Y 軸) となるように座標を回転した (図 2.4A)。一方向的に運動せずに結合解離を繰り返す変異体の場合には微小管上に並んだ輝点の位置から On-axis の向きを求めた。

金コロイド粒子で標識した頭部が微小管から解離した Unbound 状態の検出には以下のアルゴリズムを用いた。まず On-axis および Off-axis のデータから各フレーム t の前後 41 フレームの標準偏差

$$S.D.(t) = \sqrt{\frac{1}{41} \sum_{n=-20}^{20} \left\{ \left(x(t+n) - x_{average}(t) \right)^2 + \left(y(t+n) - y_{average}(t) \right)^2 \right\}}$$

$$\text{ただし、} x_{average}(t) = \frac{1}{41} \sum_{n=-20}^{20} x(t+n), y_{average}(t) = \frac{1}{41} \sum_{n=-20}^{20} y(t+n)$$

を計算し、標準偏差のヒストグラム (bin 幅 = 0.5 nm) を作成した (図 2.4B)。ヒストグラムが最大の値をとる SD 値を peak 1、peak 1 より SD が大きく、かつそれ以降で最大の値をとる SD が値を peak 2、peak 1, 2 間で最小の値をとる SD 値を threshold 1 とした。また、peak 1 と threshold 1 の中央値を threshold 2 とした。標準偏差が threshold 1 を 10 フレーム連続で超えた点の前後 41 フレームでステップが起きたフレームを unbound 状態の開始、標準偏差が threshold 2 を 10 フレーム連続で下回った点の前後 41 フレームでステップが起きたフレームを unbound 状態の終了とすることで unbound 状態を決定した。あるフレーム t 周辺でステップが起きたフレームの決定は以下のアルゴリズムで行った。フレーム t の前後 41 フレームの On-axis および Off-axis のデータがあるフレーム $t+l$ ($-20 \leq l \leq 20$) で区切られた 2 状態の階段関数 (状態 1 の値は区間 $[i-20, i+l-1]$ の平均値、状態 2 の値は区間 $[i+l+1, i+20]$ の平均値) で近似し (図 2.4C)、残差平方和

$$R.S.S.(t,l) = \sum_{n=-20}^{l-1} \left\{ \left(x(t+n) - x_{average1}(t) \right)^2 + \left(y(t+n) - y_{average1}(t) \right)^2 \right\} \\ + \sum_{n=l+1}^{20} \left\{ \left(x(t+n) - x_{average2}(t) \right)^2 + \left(y(t+n) - y_{average2}(t) \right)^2 \right\}$$

$$\text{ただし、} x_{average1}(t) = \frac{1}{20+l} \sum_{n=-20}^{l-1} x(t+n), y_{average1}(t) = \frac{1}{20+l} \sum_{n=-20}^{l-1} y(t+n),$$

$$x_{average2}(t) = \frac{1}{20-l} \sum_{n=l+1}^{20} x(t+n), y_{average2}(t) = \frac{1}{20-l} \sum_{n=l+1}^{20} y(t+n)$$

を全ての l について計算した。残差平方和を最小とする l から、あるフレーム t 周辺でステップが起きたフレームを $t+l$ と決定した。

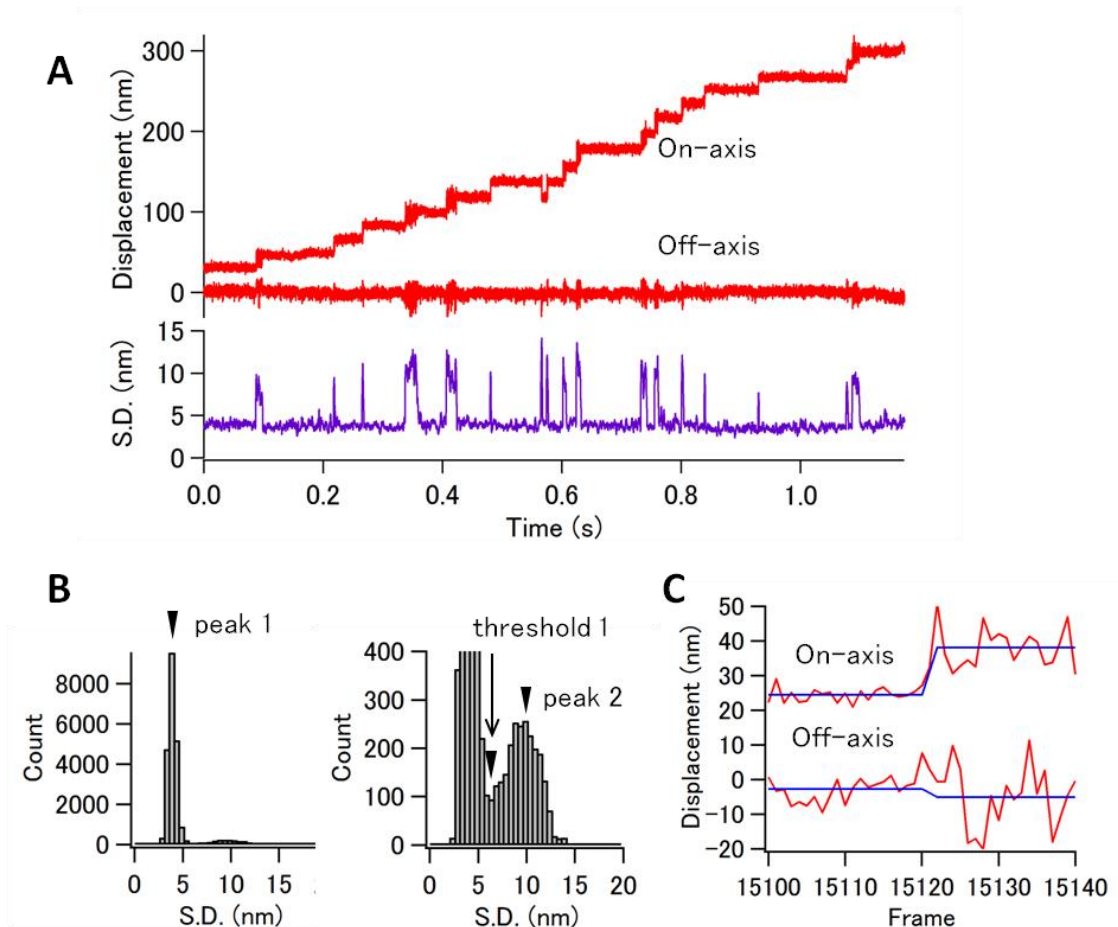


図 2.4 Unbound 状態検出アルゴリズム

(A) On-axis, Off-axis のトレース (赤) から前後 41 フレームの標準偏差 (紫) を計算。(B) 標準偏差のヒストグラムを作成し、2つのピーク間で最小の点を求める。右はヒストグラムの拡大図(C)ステップ検出アルゴリズムの例。 $i = 15120, l = 1$ のとき階段関数は青線のように求められる。トレースと階段関数の残差平方和を最小とする l をステップが起きた点とした。

第 3 章 E236A ヘテロダイマーの高時間分解能観察

キネシンが Hand-over-hand で微小管上を運動するためには、後ろ頭部が前頭部よりも先に微小管から解離する必要がある。前頭部の解離が抑えられている仕組みは、前頭部ではネックリンカーが後ろ向きに引っ張られていることによって ATP 加水分解が抑えられているためであるという仮説を立てた。これを検証するためにキネシン二量体の前頭部で ATP 加水分解がどの程度遅くなっているのか明らかにすることにした。しかし野生型の二量体では必ず後ろ頭部が先に解離してしまい (図 3.1)、前頭部の解離を検出することが難しいため、後ろ頭部を微小管から解離しにくい E236A 変異体に置き換えた E236A ヘテロダイマーを用いることにした。野生型頭部と E236A 変異体頭部を持つ E236A ヘテロダイマーでは E236A 変異体頭部が後方で野生型頭部が前方にある両足結合状態が支配的であることが一分子 FRET 法を用いた観察により明らかになっている (図 1.21) ため、前頭部は解離したあと元の位置に再結合し再び野生型頭部が前方の両足結合状態を取ると考えられる (図 3.2A)。そこで、前頭部の解離速度を測定するために、前頭部が解離している Unbound 状態の持続時間を測定することにした。しかし、Unbound 状態の持続時間は数 ms 程度であると考えられるため従来の一分子観察法では検出できない。本研究では E236A ヘテロダイマーの野生型頭部を直径 40 nm の金コロイド粒子で標識し、その運動を 55 μ s の時間分解能で測定することで Unbound 状態の検出および Bound 状態の持続時間、すなわち野生型頭部の解離速度の測定を行った (図 3.2B)。

また、前頭部のネックリンカーにかかる後ろ向きの張力が解離速度に与える影響を調べるために E236A ヘテロダイマーの両方の頭部のネックリンカーを 12 個のグリシンで伸長した変異体 (E236A ヘテロダイマー-G12) の運動を観察し、野生型頭部の解離速度の測定を行った (図 3.2C)。

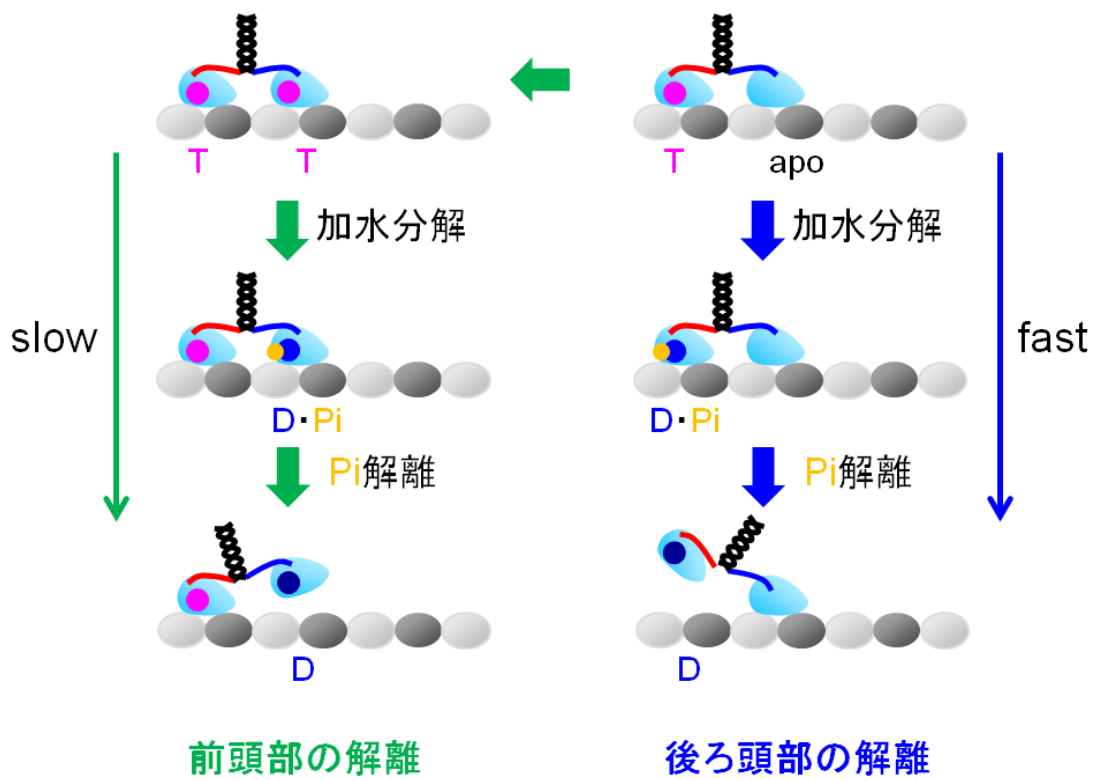


図 3.1 前頭部および後ろ頭部の解離

後ろ頭部の解離は前頭部の解離よりも速いため、前頭部の解離を検出することは難しい。

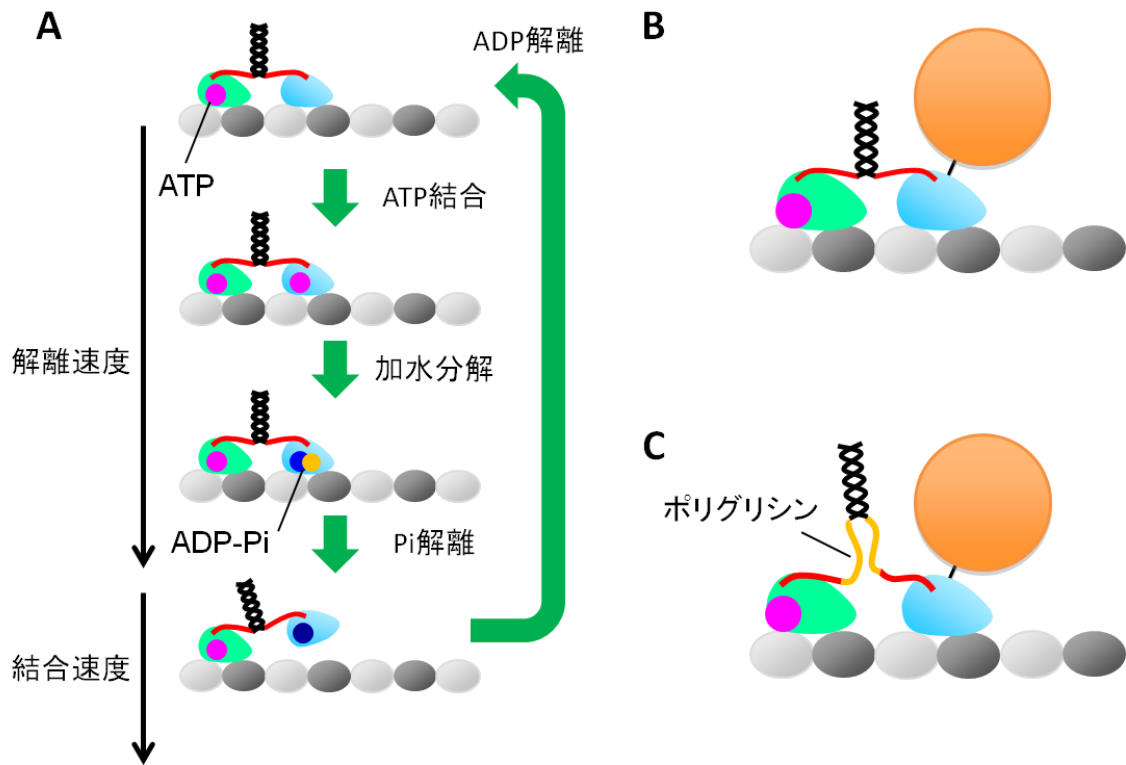


図 3.2 E236A ヘテロダイマーの模式図

(A) E236A ヘテロダイマー (緑: E236A 変異体頭部, シアン: 野生型頭部) の加水分解サイクル。後ろ頭部よりも先に前頭部が解離し、再び微小管に結合すると考えられる。(B) E236A ヘテロダイマーの野生型頭部を金コロイド粒子で標識した。(C) E236A ヘテロダイマーのネックリンカー (赤) を 12 アミノ酸のポリグリシン (黄) で伸長し、野生型頭部を金コロイド粒子で標識した。

3.1 E236A ヘテロダイマー野生型頭部の運動観察

E236A ヘテロダイマーの野生型頭部の 55 番目のアミノ酸残基に標識された金コロイド粒子の運動を 1 mM, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件で観察した。観察された輝点を二次元ガウス関数でフィッティングし On-axis (微小管プラス端方向の変位: 画像上の輝点の配列から決定) および Off-axis (微小管垂直方向の変位) の時間変化を図示した結果、一方向的な運動は示さずときおり数 nm の変位が見られた (図 3.3A)。この変位は頭部が微小管から解離した Unbound 状態であると考えられる。画像上の輝点の配列からは微小管の向きは決定できるもののどちらがプラス端方向であるのかはわからないが、キネシン頭部の構造や野生型二量体の全反射暗視野観察の結果から Unbound 状態の分布は Bound 状態の右側に位置する [Isojima, 2016] ため、Unbound 状態の分布から微小管プラス端方向を決定した。この Unbound 状態は元の位置から右後ろ方向への変位であるため (図 3.3B)、前頭部が解離し元の位置に再結合する運動 (図 1.13A) であると考えられる。この結果から、E236A ヘテロダイマーでは野生型頭部が前頭部である両足結合状態が支配的であり、ときに前頭部が解離し再び前方に結合することが示唆される。Unbound 状態におけるゆらぎの大きさを定量化するために 1 mM ATP 条件下の典型的なトレースにおいて各フレームの前後の 21 フレームの標準偏差

$$S.D.(i) = \sqrt{\frac{1}{20} \sum_{m=-10}^{10} (x(i+m) - x_{\text{average}}(i))^2}, x_{\text{average}}(i) = \frac{1}{21} \sum_{m=-10}^{10} x(i+m)$$

を On-axis 成分、Off-axis 成分それぞれについて計算した。Bound 状態では On-axis, Off-axis とともに標準偏差は 5 nm 程度であり、Unbound 状態の始まりと終わり (それぞれ state 1, state 3 とする) では標準偏差は 10 nm 程度であった。また、Unbound 状態の途中で標準偏差が Bound 状態と同じ程度まで低くなり Bound 状態の右後ろに位置する例 (state 2) が見られた (図 3.4AB)。このような Unbound 状態内の中間状態は野生型の二量体を観察した場合には見られないため、E236A ヘテロダイマーの片足結合状態は野生型二量体の片足結合状態とは異なる状態を取っていることが示唆される。このゆらぎの減少の原因として、解離した野生型頭部のネックリンカードッキングなどが考えられる。また、別の可能性として state 2 が Bound 状態であり、state 1 および state 3 がそれぞれ別の ATP の加水分解に伴った Unbound 状態であることも考えられる。

続いて 2.2.3 の Unbound 状態検出アルゴリズムを用いて Unbound 状態の検出を行った。このアルゴリズムは Unbound 状態/Bound 状態を区別する基準としてゆらぎの大きさを用いているため state 1, 2, 3 に分かれた Unbound 状態では state 1, 3 だけが検出され、state 1, 2, 3 それぞれの持続時間を測定することができた。1 mM, 10 μ M ATP, 5 μ M ATP 条件下で各 state の持続時間のヒストグラムを作成したところ、1 mM, 10 μ M ATP 条件下ではヒストグラムは指数関数でフィッティングすることができ、時定数を決定することができた。時定数は state 1 ではそれぞれ 1.5 ± 0.2 ms, 2.1 ± 0.3 ms、state 2 ではそれぞれ 4.7 ± 0.4 ms, 4.4 ± 0.5 ms、state 3 ではそれぞれ 8.6 ± 1.4 ms, 58 ± 5 ms となった (図 3.5)。State 2 の持続時間が ATP 濃度に依存せず、野生型の二量体における頭部の解離時間 10 ms の半分以下であることから、state 2 が ATP の結合と加水分解を伴う Bound 状態ではないことが明らかになった。従って、state 1 から state 3 までで一つの Unbound 状態と見なしてよいと考えられる。また、State 3 の持続時間が ATP 濃度に依存していることから State 3 は野生型二量体の Unbound 状態と同じように微小管に結合した頭部 (E236A 変異体頭部) への ATP 結合を待っている状態であるとされる。Bound 状態についても同様に各条件で持続時間のヒストグラムを作成し指数関数でフィッティングすることで平均値を求めたところ、1 mM, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下でそれぞれ、 360 ± 20 ms, 520 ± 50 ms, 980 ± 90 ms となった (図 3.5)。この結果から、E236A ヘテロダイマーの野生型頭部の解離速度は野生型二量体の後ろ頭部よりも 40 倍程度遅いことが明らかになった。また、解離速度が ATP 濃度に依存することから野生型頭部の解離は ATP の結合を伴った反応であることが確かめられた。以上の結果から、E236A ヘテロダイマーの前頭部では ATP 加水分解サイクルが阻害されており、微小管からの抑制されていることが示唆される。

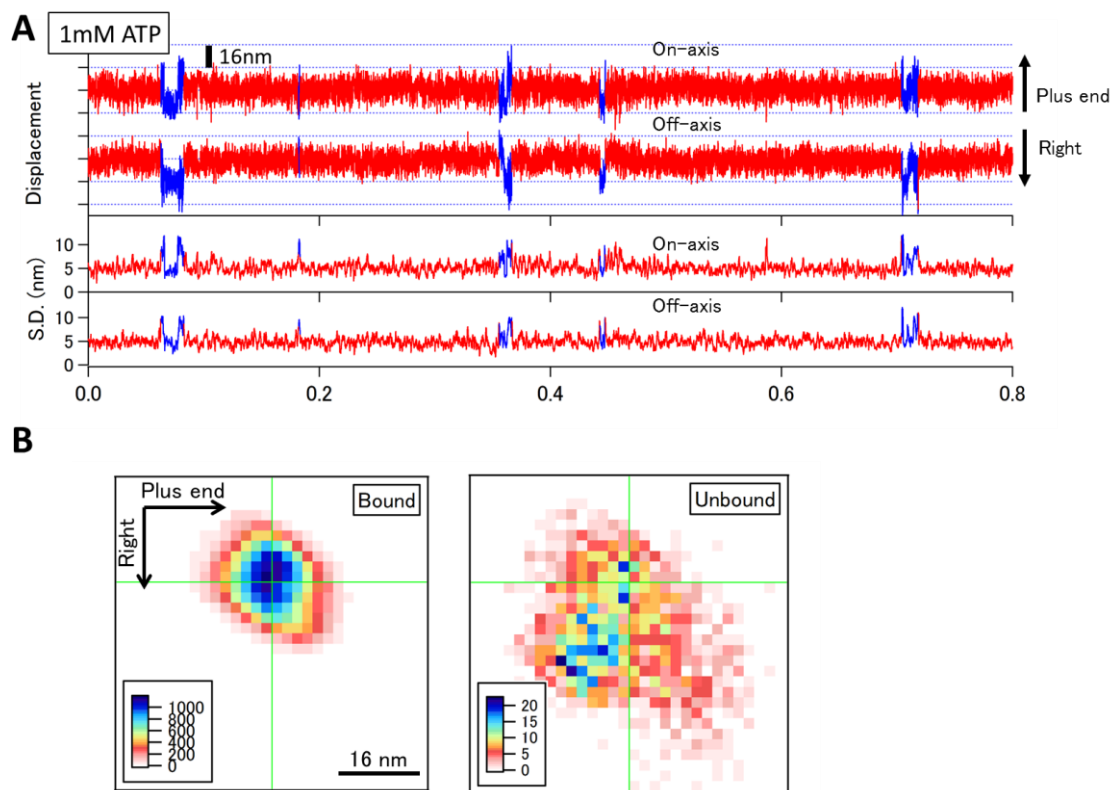


図 3.3 E236A ヘテロダイマーの運動観察

(A) (Displacement) E236A ヘテロダイマーの野生型頭部の位置の時間変化 (赤:Bound 状態,青:Unbound 状態)。(S.D.) 各フレームの前後 10 フレームごとの標準偏差 (赤:Bound 状態,青:Unbound 状態)。(B)Bound 状態, Unbound 状態それぞれの位置の二次元ヒストグラム。緑線は Bound 状態の平均位置を表す。

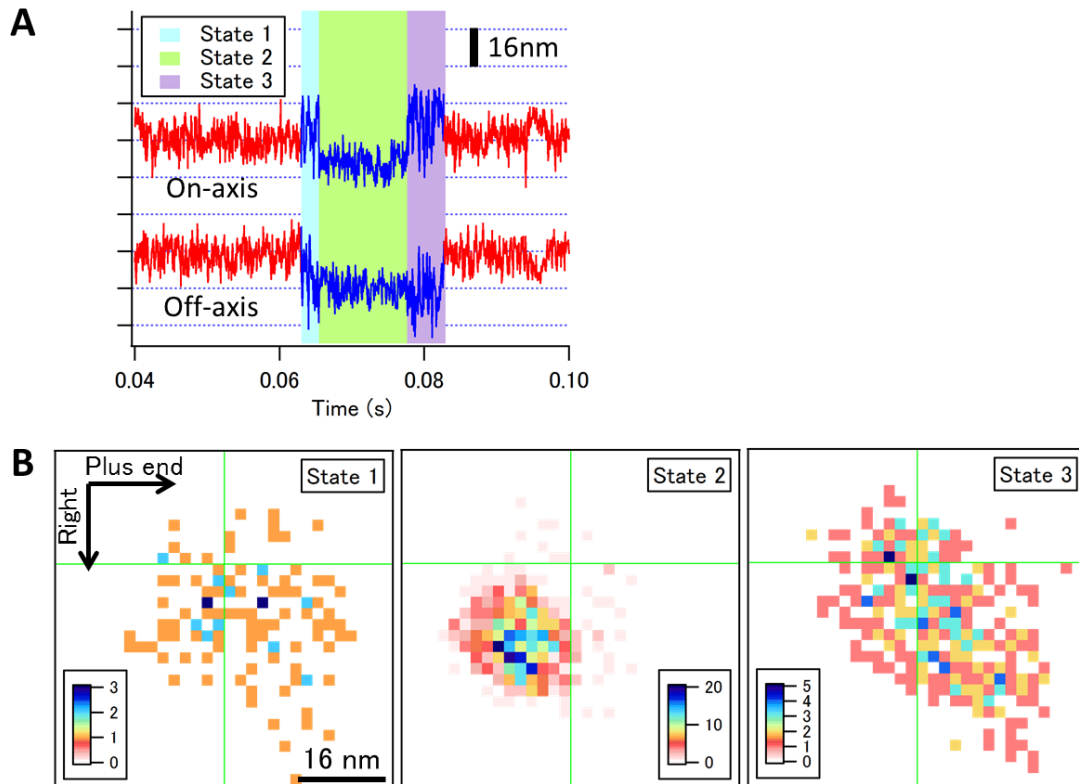


図 3.4 3 状態に分けられる Unbound 状態

(A)3 状態に分けられる Unbound 状態の例。(B)各状態の二次元ヒストグラム。緑線は Bound 状態の平均位置を表す。State 2 では分布が小さくなり、中心は Bound 状態の右後方にある。

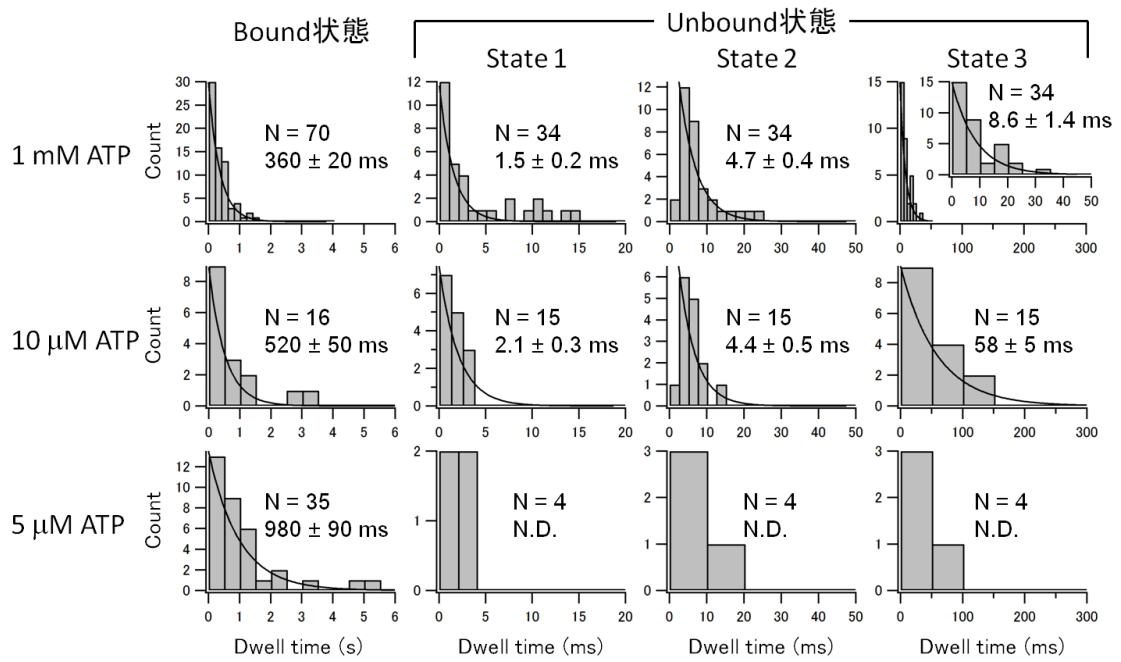


図 3.5 Bound 状態および Unbound 状態の持続時間

1 mM, 10 μM, 5 μM ATP 条件下における Bound 状態および Unbound 状態の持続時間のヒストグラム。Unbound 状態は state 1-3 に区別しそれぞれの持続時間を測定した。ヒストグラムを指数関数でフィッティングすることで時定数を決定した。5 μM ATP 条件下では 3 状態に区別できるデータを十分得られずフィッティングを行うことができなかった。

3.2 ネックリンカーを伸長した E236A ヘテロダイマー野生型頭部の

運動観察

E236A ヘテロダイマーの前頭部の解離速度を測定した結果、二量体の前頭部では微小管からの解離が抑制されていることが明らかになった。続いては前頭部の解離抑制へのネックリンカーの役割を調べるためにネックリンカーを伸長した E236A ヘテロダイマー (E236A ヘテロダイマー-G12) の運動観察を行った。E236A ヘテロダイマー-G12 は E236A ヘテロダイマーのそれぞれのネックリンカーとコイルドコイルの間にそれぞれグリシンを 12 個挿入することで作成された。これにより頭部間の距離が 8 nm 伸長され、前頭部においてネックリンカーがドッキングしやすくなることが期待される。

E236A ヘテロダイマー-G12 の野生型頭部の 55 番目のアミノ酸残基に標識された金コロイド粒子の運動を 1 mM ATP 条件で観察した。観察された輝点を二次元ガウス関数でフィッティングし On-axis および Off-axis の時間変化を図示した結果、ネックリンカーを伸長しない場合と同様に一方向的な運動は示さず、ときおり右後方へゆらぐ Unbound 状態が見られたが、ネックリンカーを伸長しない場合とは異なり Unbound 状態の中にゆらぎの小さい state 2 は含まれなかった (図 3.6A,B,C)。

続いて 2.2.3 のアルゴリズムを用いて Unbound 状態の検出を行った。Unbound 状態の持続時間のヒストグラムを作成したところ指数関数でよくフィッティングでき、時定数は 2.8 ± 0.3 ms であった (図 3.6D)。これは野生型二量体の Unbound 状態の持続時間 2.1 ± 0.2 ms [Isojima, 2016] と近い値である。このことから、E236A ヘテロダイマー-G12 の Unbound 状態はネックリンカー伸長のない E236A ヘテロダイマーの場合とは異なり、野生型二量体の Unbound 状態に近い状態であることが示唆される。Bound 状態の持続時間についても同様にヒストグラムを作成したところ指数関数でフィッティングでき、時定数は 192 ± 16 ms であった (図 3.6D)。これはネックリンカー伸長のない場合の半分程度の値である。この結果から、E236A ヘテロダイマーの前頭部における ATP 加水分解サイクルの阻害にはネックリンカーの張力が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

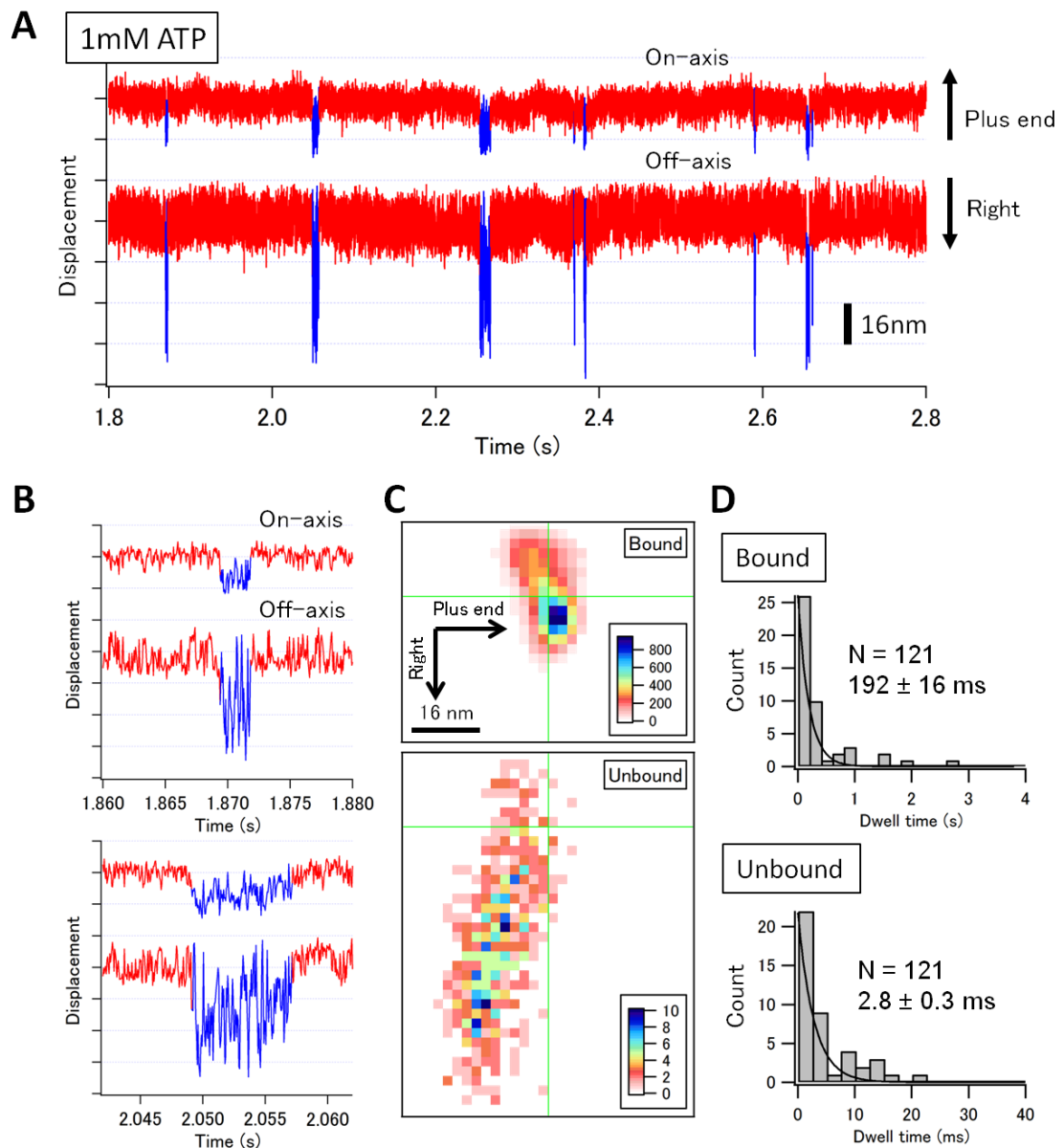


図 3.6 E236A ヘテロダイマー-G12 の運動観察

(A) E236A ヘテロダイマーの野生型頭部の位置の時間変化 (赤:Bound 状態,青:Unbound 状態)。 (B)Unbound 状態の拡大図。ネックリンカー伸長のない場合とは異なり、ゆらぎの小さな状態は見られない。 (C)Bound 状態および Unbound 状態の二次元ヒストグラム。緑線は Bound 状態の平均位置を表す。Unbound 状態は Bound 状態の右後ろに分布している。 (D) Bound 状態および Unbound 状態の持続時間のヒストグラム。指数関数でフィッティングすることで時定数を求めた。

3.3 本章のまとめと考察

両足結合状態において前頭部の解離が抑制されるメカニズムについて明らかにするために、E236A ヘテロダイマーを用いて後ろ頭部を固定し、野生型頭部の運動を観察することで前頭部の解離速度を定量的に測定した。その結果前頭部の解離速度は 1 mM ATP 条件で 2.7 s^{-1} であり ($1/360 \text{ ms}$)、野生型二量体の後ろ頭部の解離速度 (100 s^{-1} ($1/10 \text{ ms}$)) 倍程度遅いことが明らかになった。また、E236A ヘテロダイマーにおける Unbound 状態は野生型二量体の Unbound 状態とは異なりゆらぎの大きさの異なる 3 状態に分けられることがわかった。この原因としてはリン酸を解離して微小管から解離した直後はネックリンカーがドッキング状態を取っており、その後アンドック状態を取ることによって微小管に再結合するという可能性が考えられる。

次に、前頭部の解離抑制におけるネックリンカーの役割を調べるために、ネックリンカーを伸長した E236A ヘテロダイマーを用いて同様の測定を行った結果、前頭部の解離にかかる時間はネックリンカーを伸長しない場合の半分程度 (190 ms) に低下した。この結果はネックリンカーが後ろ向きに引っ張られることが前頭部における解離抑制に関わっていることを示唆している。しかし、野生型二量体の後ろ頭部の解離にかかる時間 (10 ms) よりも依然として長いことからネックリンカーの張力よりも向きが解離抑制に重要であることが示唆される。

第 4 章 タンデムキネシンの高時間分解能観察

第 3 章では両足結合状態で後ろ頭部が先に解離する仕組みについて議論したが、協調的な二足歩行を行うためには、後ろ頭部が解離したあと、後ろの結合部位に再結合することなく選択的に前の結合部位に結合する必要がある。本章では浮いた頭部の選択的結合の仕組みを明らかにするためにタンデムキネシンを用いることにした。1.6 で述べたように 2 つのキネシン頭部の N 末端とネックリンカーをタンデムに結合し作成されたタンデムキネシンは、野生型キネシンと同じように Hand-over-hand マナーで運動すると仮定すると C-head の Biased diffusion メカニズムによるステップと N-head の Biased binding メカニズムによるステップを交互に繰り返すと考えられる。蛍光一分子観察および ATP 加水分解反応速度測定の結果から、タンデムキネシンが微小管上を運動するとき ATP が無駄に消費されることで運動速度が野生型二量体の 1/4 程度まで遅くなっていることが明らかにされた [Isojima, 2013]。この結果はタンデムキネシンにおいて Biased diffusion メカニズムによるステップもしくは Biased binding メカニズムによるステップの少なくとも一方で前方への移動を伴わない頭部の結合解離（後ろ頭部の解離→再結合）がなされていることを示唆している。本章ではタンデムキネシンの N-head または C-head を 40 nm 金コロイドで標識し、それぞれの運動を暗視野顕微鏡により 50 マイクロ秒の時間分解能で観察した。タンデムキネシンのそれぞれの頭部が微小管から解離した Unbound 状態を検出し、それぞれの頭部における再結合確率やステップにかかる時間などを測定することで、Biased diffusion メカニズムと Biased binding メカニズムがそれぞれの程度効率的に選択的前方ステップを引き起こしているか明らかにすることにした (図 4.1)。

さらに、前方ステップにおける微小管に結合した頭部のネックリンカードッキングの役割を明確にするために N-head のネックリンカーをアラニンに置換しネックリンカードッキングを阻害したタンデムキネシンの運動観察を試みた。ネックリンカーは 323 番から 336 番目のアミノ酸までの 14 残基からなり、頭部に ATP が結合するとネックリンカーと頭部が相互作用し 326-330 番残基および 331-334 番残基は β シート構造 ($\beta 9$, $\beta 10$) を形成する。Ling は単頭キネシンの $\beta 9$, $\beta 10$ およびその間のセリン残基の 9 アミノ酸をアラニンに置換した変異体頭部 ($\beta 9, \beta 10$ -9A 変異; 図 4.2A) の ATP 加水分解速度を測定することで、変異の導入により単頭の ATP 加水分解速度は野生型単頭の 1.5 倍程度遅くなることを示した。また、Isojima は一方のネックリンカーにこの変異を加

えたヘテロ二量体の野生型頭部を金コロイドで標識し、全反射暗視野顕微鏡を用いてその運動を観察し、その結果微小管に結合した頭部のネックリンカーに変異が加わると、野生型頭部の Unbound 状態の持続時間が 100 倍程度長くなることを示した(図 4.2B)。この結果は、微小管に結合した頭部のネックリンカードッキングが浮いた頭部の前方ステップに重要であることを示唆するものである。本研究ではタンデムキネシンにこの変異を導入することでネックリンカードッキングが Biased diffusion メカニズムで運動する C-head の選択的ステップに与える影響を調べた。

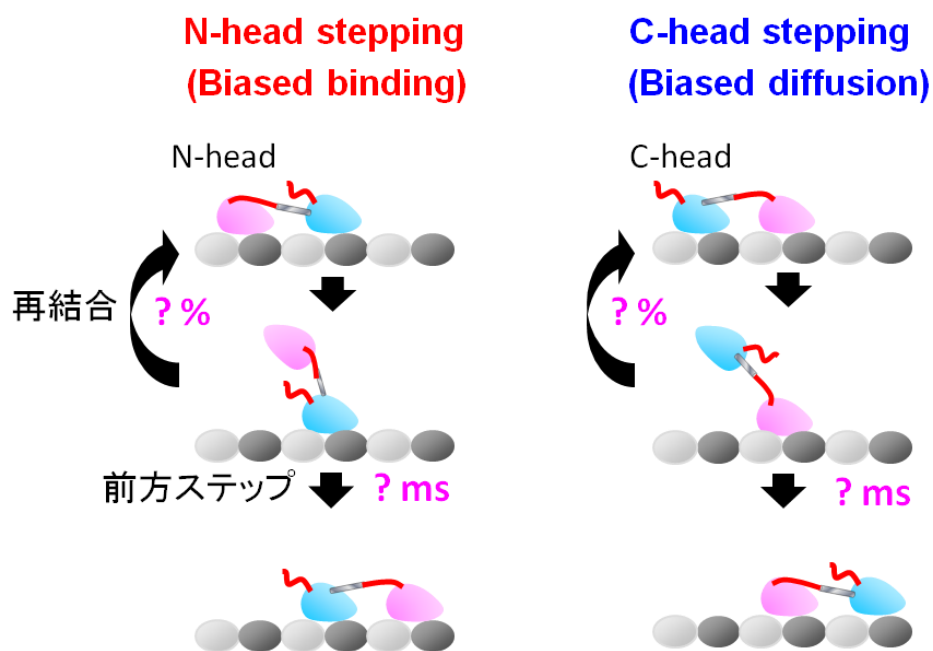


図 4.1 タンデムキネシンを用いた前方ステップモデルの検証

タンデムキネシンのそれぞれの頭部の再結合確率やステップにかかる時間を測定することで、Biased diffusion メカニズムと Biased binding メカニズムがそれぞれどの程度効率的に選択的前方ステップを引き起こし得るかを明らかにできると考えられる。

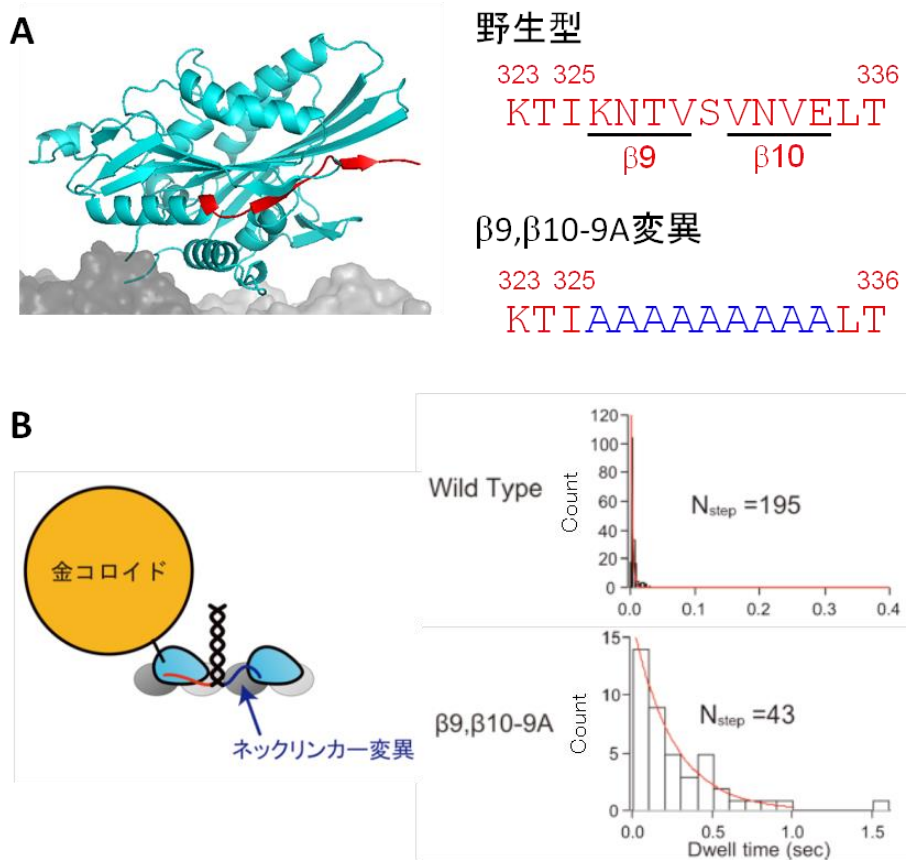


図4.2 β9,β10-9A 変異

(A)ネックリンカー (赤)は頭部と相互作用したドッキングを取ると2つのβシート構造(β9, β10)を形成する。β9,β10-9A変異体はβ9からβ10までの9アミノ酸がアラニンに置換された変異体である。(B)片方の頭部のネックリンカーにβ9,β10-9A変異を導入したヘテロダイマーの野生型頭部を高速一分子運動観察したところ、Unbound状態の持続時間は 250 ± 20 msであり、野生型二量体よりも100倍長くなった。これは微小管に結合した頭部へのネックリンカーのドッキングが浮いた頭部の前方へのステップに重要であることを示唆するものである。図は[Isojima, 2013]より引用。

4.1 金コロイド標識したタンデムキネシンの運動速度

まず N-head を金コロイドで標識したタンデムキネシンの運動を様々な ATP 条件下で観察した。N-head の 55 番目のシステイン残基に標識された直径 40nm の金コロイドの運動を 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下で全反射暗視野顕微鏡によって観察した。観察された輝点を二次元ガウス関数でフィッティングし時間変化を求めた結果、どの ATP 濃度でもタンデムキネシンは一方向性の連続的な運動を示した (図 4.3)。続いて On-axis 方向への変位の時間変化を 1 次関数でフィッティングすることにより各トレースにおける運動速度を求めた。各 ATP 濃度における運動速度の平均値は 135 ± 21 nm/s (平均値 \pm 標準誤差; N=16), 114 ± 12 nm/s (N=20), 80 ± 13 nm/s (N=5), 63 ± 9 nm/s (N=13), 47 ± 7 nm/s (N=6), 17 ± 2 nm/s (N=8) となり、ATP 濃度が下がるにつれて運動速度が低下した。

続いて C-head を金コロイドで標識したタンデムキネシンの運動を観察した。C-head に標識された金コロイドの運動を ATP 濃度を変えて観察したところどの ATP 濃度でも一方向性の連続的な運動を示した (図 4.4)。N-head と同様に On-axis 方向の変位の時間変化を 1 次関数でフィッティングすることにより各トレースにおける運動速度を測定した。各 ATP 濃度における運動速度の平均値は 215 ± 21 nm/s (N=10), 170 ± 23 nm/s (N=16), 142 ± 14 nm/s (N=18), 103 ± 18 nm/s (N=11), 72 ± 14 nm/s (N=11), 32 ± 3 nm/s (N=13) となり、ATP 濃度依存性が下がるにつれて運動速度が低下した。またどの ATP 濃度でも N-head を標識した場合よりも運動速度が大きくなった。N-head の運動速度が低下した原因として N-head が微小管から解離したあと、前方へステップする過程が金コロイド粒子によって遅くなる可能性が考えられるが、4.4 で述べるように N-head の Unbound 状態の持続時間は 3 ms 程度と C-head の Unbound 状態の持続時間と変わらないことから、この可能性は否定された。別の可能性としては N-head を金コロイドで標識した場合には、C-head の運動が金コロイド粒子によって阻害されて後方への再結合確率が高くなるため、N-head の Bound 状態が長くなり速度が低下したと説明することができる。

またタンデムキネシンの 11 個のプロリンからなるリンカーの 6 番目のプロリンをシステインに置換することで金コロイド粒子をつけ、リンカーにつけた金コロイド粒子の運動を観察した。6 番目のプロリンはポリプロリンリンカーのちょうど中央であり、タンデムキネシンの重心位置の変位を示すと考えられる。標識された金コロイド粒子の散

乱光を 1 mM, 20 μ M ATP 条件下において 20,000 fps で観察し、金コロイド粒子の中心位置を求め、On-axis 成分と Off-axis 成分の時間変化を図示したところ、いずれの条件においてもステップ状の一方向的な運動を示した (図 4.5)。頭部を標識した場合と同様に On-axis 方向の変位の時間変化を 1 次関数でフィッティングすることにより各トレースにおける運動速度を測定した。各 ATP 濃度における運動速度の平均値は 186 ± 22 nm/s (N=12) , 78 ± 5 nm/s (N=17) であり、どちらの ATP 濃度でも N-head 標識と C-head 標識の場合の中間の速度であった。

続いてそれぞれの頭部を標識した場合の運動速度の ATP 濃度依存性がミカエリス・メンテン式によって記述できるかどうかを調べた。各 ATP 濃度における運動速度をプロットしミカエリス・メンテン式でフィッティングしたところ、どちらの頭部を標識した場合でもよくフィッティングでき、フィッティングによって得られたパラメータは N-head 標識で $V_{\max}=135 \pm 13$ nm/s , $K_m=30 \pm 5$ μ M、C-head 標識では $V_{\max}=214 \pm 17$ nm/s , $K_m=27 \pm 4$ μ M となった (図 4.6)。これを野生型二量体 ($V_{\max}=695 \pm 28$ nm/s , $K_m=24.6 \pm 3.9$ μ M [Isojima, 2013]) の場合と比較すると、どちらの頭部を標識した場合でも K_m は変わらず V_{\max} が低下している。この結果はタンデムキネシンにおいては N-head または C-head のいずれかのステップが遅くなっていることを示唆している。

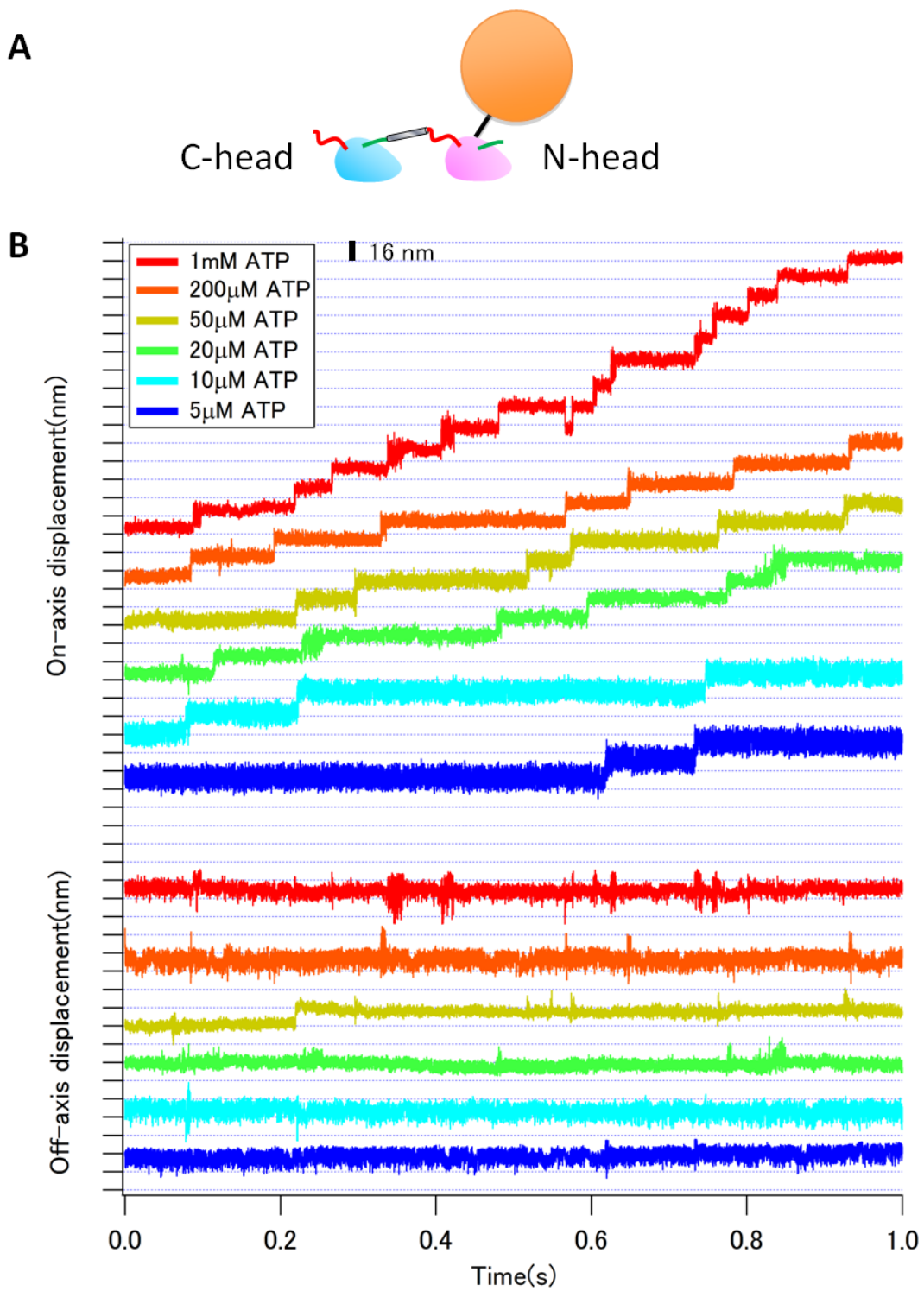


図 4.3: タンデムキネシン N-head のトレース例

(A) タンデムキネシンの N-head に金コロイド粒子を標識した。(B) 1 mM, 200 μM, 50 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM ATP 条件下における典型的トレース

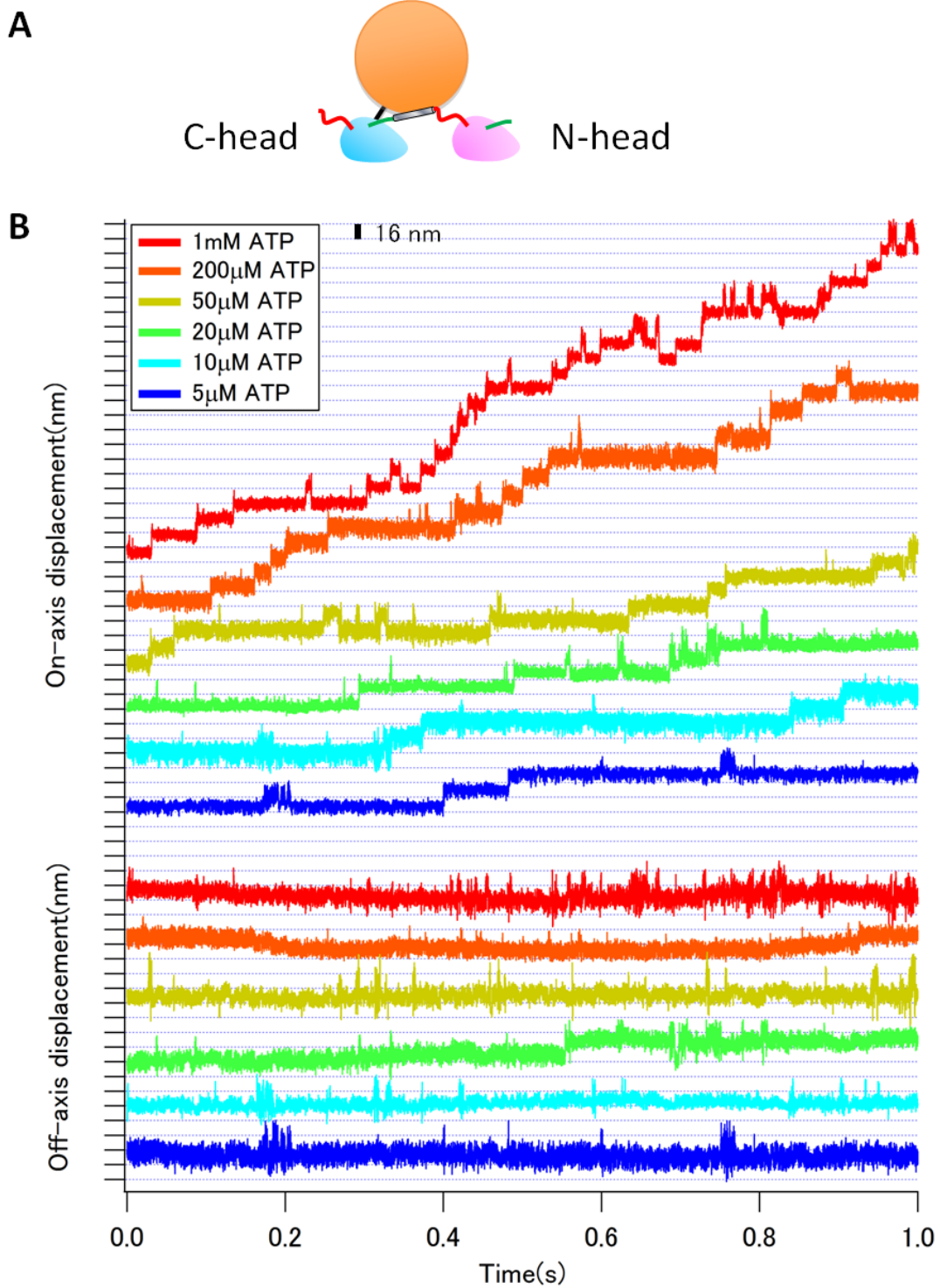


図 4.4: タンデムキネシン C-head のトレース例

(A)タンデムキネシンの C-head に金コロイド粒子を標識した。(B)1 mM, 200 µM, 50 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM ATP 条件下における典型的トレース

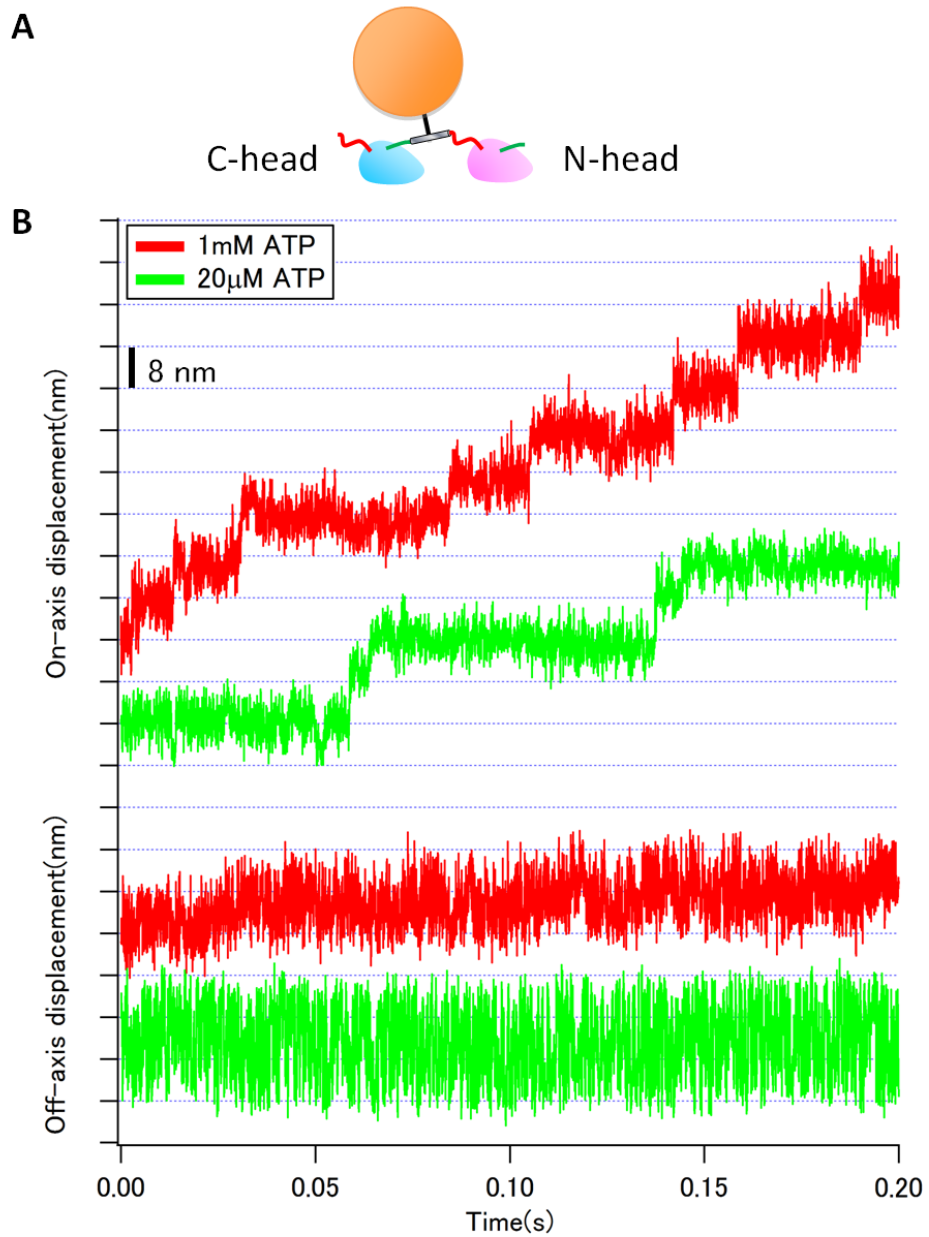


図 4.5: ポリグリシンリンカーを金コロイドで標識したタンデムキネシンのトレース例
 (A)タンデムキネシンのポリプロリンリンカーに金コロイド粒子を標識した。(B)1 mM,
 20 μ M ATP 条件下における典型的トレース

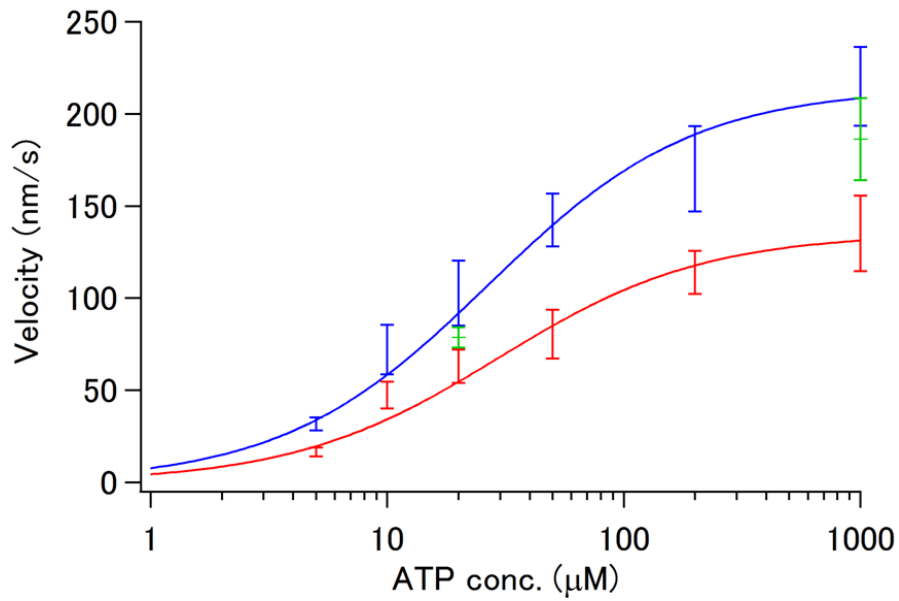


図 4.6: 金コロイド標識したタンデムキネシンの運動速度

各 ATP 濃度における金コロイド標識したキネシンの運動速度 (赤: N-head 標識, 青: C-head 標識, 緑: リンカー標識, いずれの場合も運動速度 ± 標準誤差) をミカエリス・メンテン式でフィッティングした。リンカー標識は 2 点のみなのでフィッティングは行わなかった。フィッティングによって得られたパラメータは N-head 標識で $V_{\max}=135 \pm 13$ nm/s, $K_m=30 \pm 5$ μM、C-head 標識では $V_{\max}=214 \pm 17$ nm/s, $K_m=27 \pm 4$ μM (平均値 ± フィッティングエラー) となった。

4.2 タンデムキネシンのステップ検出

続いて N-head を標識した場合の運動トレースを用いてステップの検出を行った。On-axis 方向の変位の時間変化はいずれの ATP 濃度においてもステップ状であり、またいずれの条件においてもステップの直前に一時的なゆらぎの増大が見られた。ゆらぎの大きさを定量化するために 1 mM ATP 条件下の典型的なトレースにおいて各フレームの前後の 21 フレームの標準偏差

$$S.D.(t) = \sqrt{\frac{1}{20} \sum_{m=-10}^{10} (x(t+m) - x_{\text{average}}(t))^2}, x_{\text{average}}(t) = \frac{1}{21} \sum_{m=-10}^{10} x(t+m)$$

を On-axis 成分、Off-axis 成分それぞれについて計算したところ、ステップ前はどちらの成分でも標準偏差は 3 nm 程度で、ステップの直前に 10 nm 程度に増大し、ステップ後再び 3 nm 程度に戻るといった遷移を繰り返すことが示された。このようなステップ直前の一時的な標準偏差の増大は野生型キネシンドイマーで見られた結果と一致していることから、標準偏差の小さい状態は金コロイド粒子を標識した N-head が微小管に結合している状態 (Bound 状態) であり、一方標準偏差の大きい状態は N-head が微小管から浮いている状態 (Unbound 状態) であることが示された。そこで 2.2.3 節の Unbound 状態検出アルゴリズムを用いることで Unbound 状態と Bound 状態を判別した (図 4.7)。1 mM ATP 条件下で個々の Bound 状態における On-axis 成分の平均位置を求め、一つ前の Bound 状態における位置との差を取ることでステップサイズを求めた。ステップサイズのヒストグラムは 2 つのガウス関数でよくフィッティングでき、ピーク位置はそれぞれ 0.4 ± 0.2 nm, 17.1 ± 0.1 nm (平均値 \pm フィッティングエラー) となった (図 4.8)。微小管上の前後に隣り合う結合サイトの間隔は約 8 nm であることから、N-head は後ろ頭部の状態で微小管から解離し、C-head を追い越して C-head の 8 nm 前方の結合サイトに結合していることが裏付けられた。

続いて C-head を標識した場合の運動トレースを用いてステップの検出を行った。On-axis 方向の変位の時間変化はいずれの ATP 濃度においてもステップ状であり、またいずれの条件においてもステップの直前に一時的なゆらぎの増大が見られた。1 mM ATP 条件下の典型的なトレースにおいて各フレームの前後の 21 フレームの標準偏差を On-axis 成分、Off-axis 成分それぞれについて計算したところ、前方への移動を伴わない一時的なゆらぎの増大が頻繁に見られた。これらは頭部が微小管から解離したあと元

の結合部位へ再結合する様子を示していると考えられる。2.2.3 節の Unbound 状態検出アルゴリズムを用いて Unbound 状態と Bound 状態を判別した (図 4.9)。N-head の場合と同様に 1 mM ATP 条件下でステップサイズを求めたところ、ステップサイズのヒストグラムは 2 つのガウス関数でよくフィッティングでき、ピーク位置はそれぞれ 0.0 ± 0.1 nm, 17.2 ± 0.1 nm (平均値 \pm フィッティングエラー) となった (図 4.10)。N-head の場合と比べると 0 nm のピークの頻度が高くなっており、これは浮いた C-head の再結合が頻繁に起きていることを示唆している。また、前方へのステップサイズが 17.2 nm であることから、C-head が前方へステップするとき、C-head は後ろ頭部の状態で微小管から解離し、N-head を追い越して N-head の 8 nm 前方の結合サイトに結合していることが裏付けられた。

リンカーを標識した場合の運動トレースを用いてステップの検出を行った。頭部を標識した場合と同様にいずれの ATP 濃度においてもステップ状の運動が見られた。1 mM ATP 条件下の典型的なトレースにおいて各フレームの前後の 21 フレームの標準偏差を On-axis 成分、Off-axis 成分それぞれについて計算したところ、頭部を標識した場合は異なりステップ直前の一時的な揺らぎの増大は見られなかった。目視によってステップを判別し、2.2.3 のステップ検出アルゴリズムを用いることでステップを検出した (図 4.11)。20 μ M ATP 条件下においてステップサイズを求めヒストグラムを作成したところ、ガウス関数でよくフィッティングでき、ピーク位置は 8.2 ± 0.2 nm (平均値 \pm フィッティングエラー) となった (図 4.12)。この結果は、タンデムキネシンの重心位置は N-head ないし C-head がステップするたびに 8.2 nm 移動することを裏付けるものである。

タンデムキネシンが Hand-over-hand マナーで運動すると仮定すると、N-head が前方へステップするときは C-head を追い越して 16 nm 前方の結合サイトへ結合し、一方 C-head が前方へステップするときは N-head を追い越して 16 nm 前方の結合サイトへ結合し、また重心位置は 8 nm 程度前方へ移動すると考えられる。上記の結果はこれを裏付けるものであり、タンデムキネシンは野生型キネシンと同じように Hand-over-hand マナーでステップしていることが示された。したがって、タンデムキネシンは Biased diffusion メカニズムによる C-head のステップと Biased binding メカニズムによる N-head のステップを交互に繰り返していると考えられる (図 4.13)。

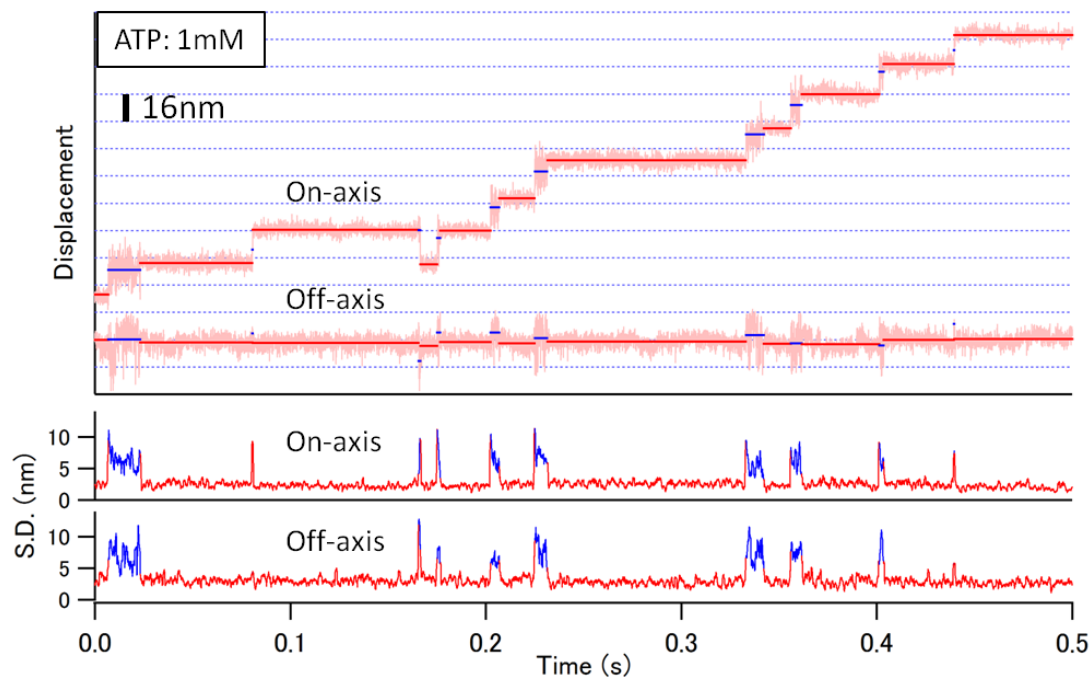


図 4.7: 1 mM ATP 条件下における N-head の変位と標準偏差の時間変化

(Displacement) 典型的なトレース (ピンク) と、各状態別の平均値 (赤:Bound 状態, 青:Unbound 状態) を示す。

(S.D.) 上のトレースについて各フレームの前後 10 フレームごとの標準偏差を求めた (赤:Bound 状態, 青:Unbound 状態)。

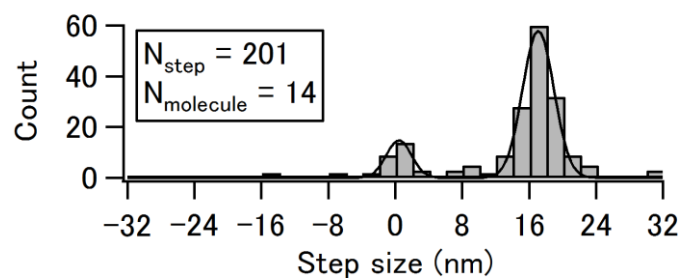


図 4.8: N-head のステップサイズของヒストグラム

1 mM ATP 条件下の全トレースでステップサイズを求めヒストグラムを作成した。ヒストグラムは 2 つのガウス関数でよくフィッティングでき、ピーク位置はそれぞれ 0.4 ± 0.2 nm, 17.1 ± 0.1 nm であった

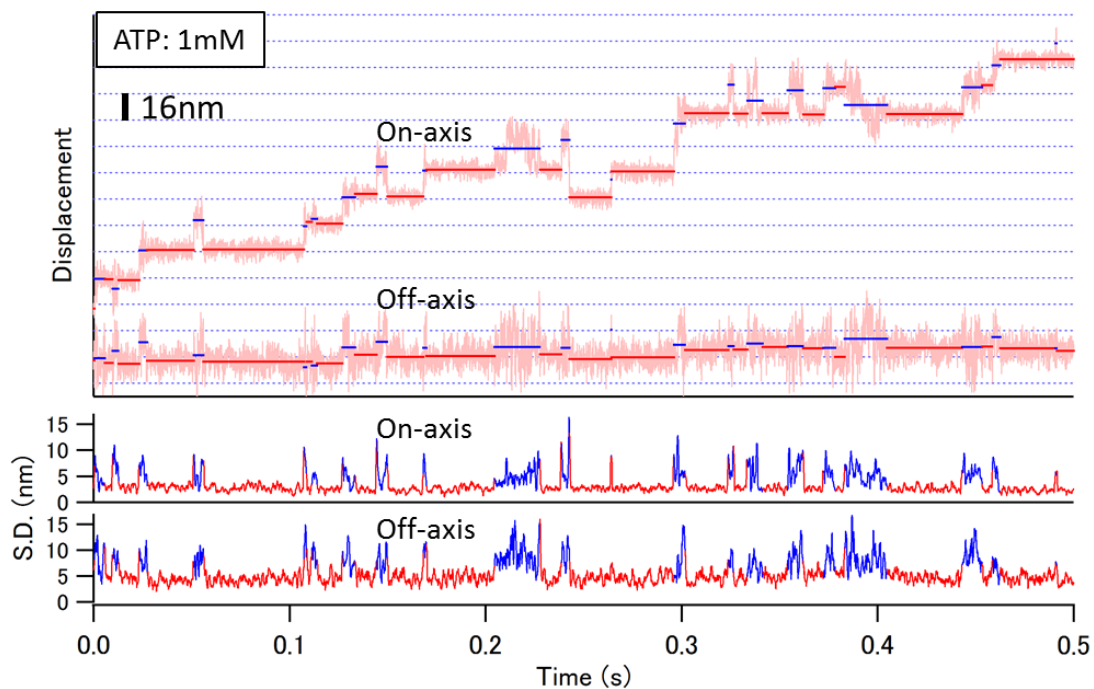


図 4.9: 1 mM ATP 条件下における C-head の変位と標準偏差の時間変化

(Displacement) 典型的なトレース (ピンク) と、各状態別の平均値 (赤:Bound 状態, 青:Unbound 状態) を示す。

(S.D.) 上のトレースについて各フレームの前後 10 フレームごとの標準偏差を求めた (赤:Bound 状態, 青:Unbound 状態)。

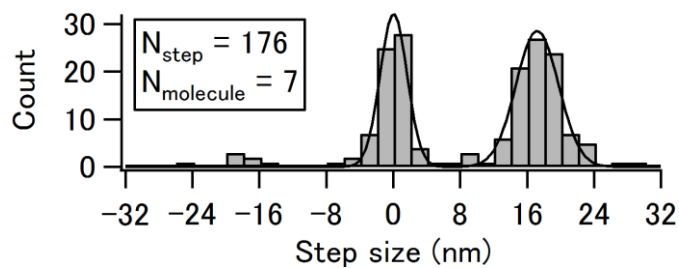


図 4.10: C-head のステップサイズのヒストグラム

1 mM ATP 条件下の全トレースでステップサイズを求めヒストグラムを作成した。ヒストグラムは 2 つのガウス関数でよくフィッティングでき、ピーク位置はそれぞれ 0.0 ± 0.1 nm, 17.2 ± 0.1 nm であった

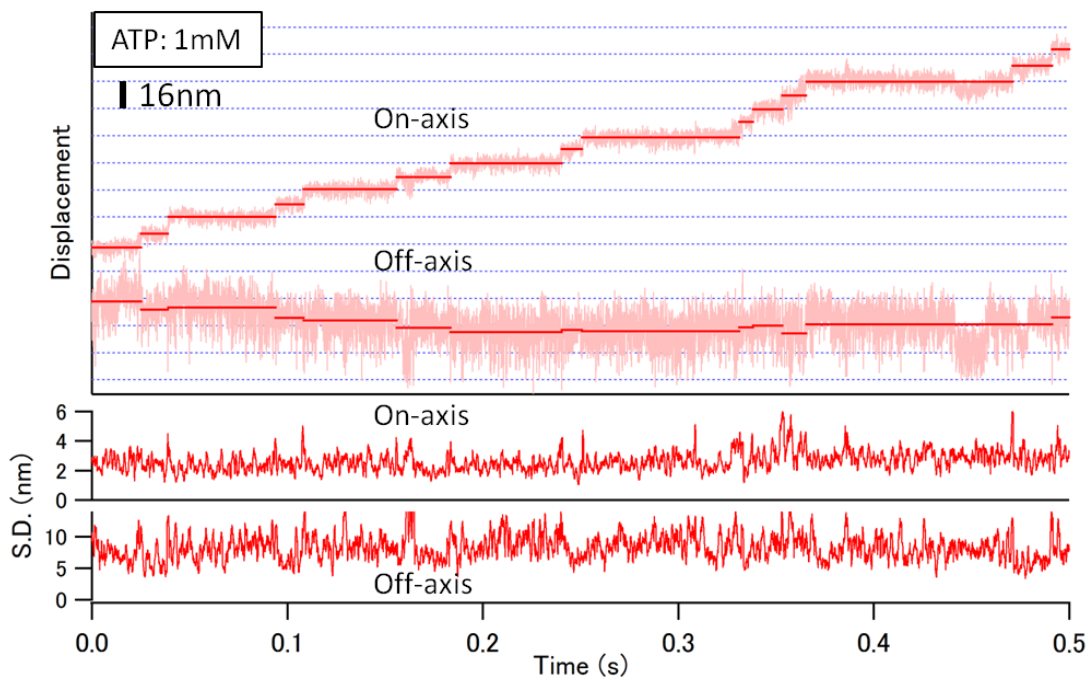


図 4.11: 1 mM ATP 条件下における重心位置の変位と標準偏差の時間変化

(Displacement) 典型的なトレース (ピンク) と、各ステップの平均値 (赤) を示す。

(S.D.) 上のトレースについて各フレームの前後 10 フレームごとの標準偏差を求めた (赤)。

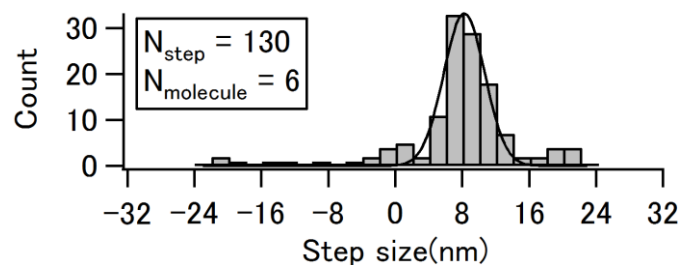


図 4.12: 重心位置のステップサイズのヒストグラム

20 μ M ATP 条件下の全トレースでステップサイズを求めヒストグラムを作成した。ヒストグラムはガウス関数でよくフィッティングでき、ピーク位置は 8.2 ± 0.2 nm であった。

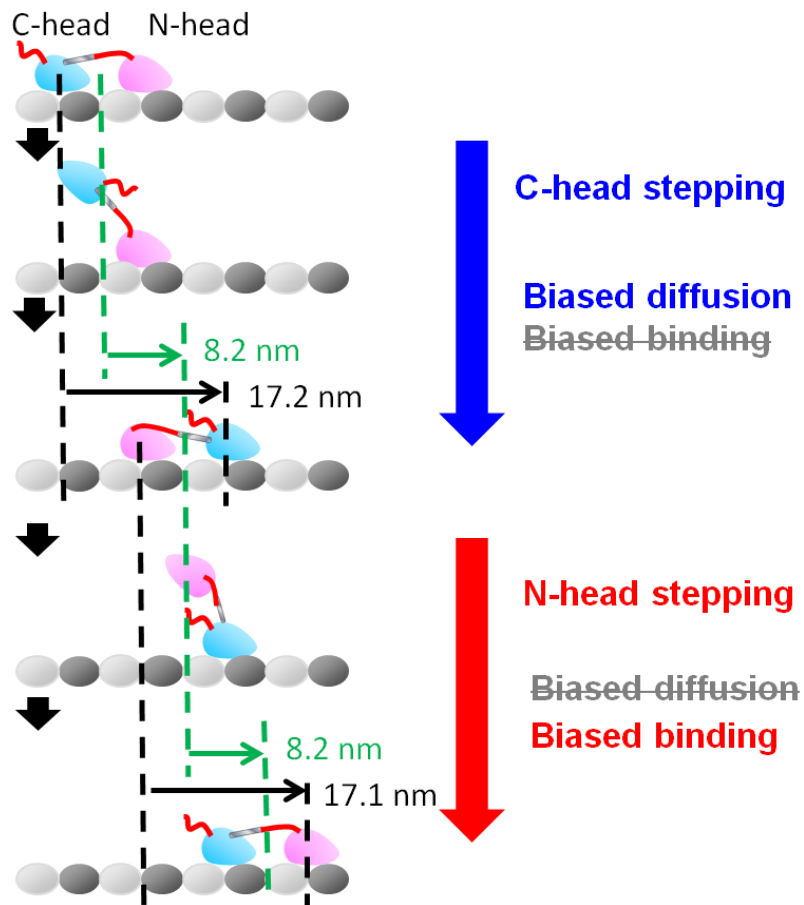


図 4.13: タンデムキネシンの運動は Hand-over-hand モデルで説明できる

タンデムキネシンは野生型キネシンと同様に後ろ頭部が解離後 16 nm 前方の結合サイトに結合し、全体として 8 nm ずつ前へ移動することを繰り返す Hand-over-hand マナーで運動している。したがって、タンデムキネシンは Biased diffusion メカニズムによる C-head のステップと Biased binding メカニズムによる N-head ステップを交互に繰り返していると考えられる。

4.3 タンデムキネシンのステップの分類

4.2 で述べたように C-head の運動では解離したあと同じ結合部位に再結合する様子が頻繁に見られた。解離してゆらぎの大きくなった Unbound 状態からゆらぎの小さい Bound 状態への遷移には以下の 4 種類の異なる過程が考えられる。(1)後ろ頭部が解離し、16 nm 前方の結合部位に結合する (前方ステップ:図 4.14(1))、(2)後ろ頭部が解離し、元いた後方の結合部位に再び結合する (後ろ頭部の再結合:図 4.14 (2))、(3)前頭部が解離し、元いた前方の結合部位に再び結合する (前頭部の再結合:図 4.14 (3))、(4)前頭部が解離し、16 nm 後方の結合部位に結合する (バックステップ:図 4.14 (4))。Unbound 状態から Bound 状態への遷移過程を分類するために Unbound 状態の前および後の Bound 状態の On-axis の平均値を 100 フレームにわたって計算し、Unbound 前後の Bound 状態の平均値の差が 8 nm を超える場合は(1)、-8 nm を下回る場合は(4)、それ以外の場合で Unbound 状態での平均変位が前の Bound 状態での平均変位よりも大きい場合を(2)、小さい場合を(3)とした。

N-head および C-head の 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下における運動トレースから、全ての Unbound 状態を(1)-(4)の各種に分類した (図 4.15)。全ての Unbound 状態のうち前頭部の解離を伴うものの割合 $((3) + (4)) / ((1) + (2) + (3) + (4))$ を N-head および C-head の各 ATP 濃度条件下の結果から求めたところ、N-head では 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下においてそれぞれ 6.0 %, 22.5 %, 4.4 %, 14.6 %, 12.1 %, 5.0 %、C-head ではそれぞれ 9.5 %, 9.0 %, 12.1 %, 4.8 %, 17.9 %, 11.9 %となり、N-head および C-head はどちらも前頭部の状態で解離する頻度が低いことが示された (図 4.16)。今回の実験の目的は解離した後ろ頭部の前方への選択的結合性について調べることであるため、以後は後ろ頭部が解離した場合((1),(2))だけを詳しく解析することにする。後ろ頭部の状態から解離した N-head および C-head の選択的結合性について調べるために、後ろ頭部の再結合確率 $(2) / ((1) + (2))$ を N-head および C-head の各 ATP 濃度条件下で求めたところ、N-head では 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下においてそれぞれ 7.7 %, 8.4 %, 20.9 %, 12.5 %, 9.8 %, 0.0 %となり ATP 濃度依存性は見られなかったものの、C-head ではそれぞれ 34.2 %, 44.8 %, 48.8 %, 55.1 %, 52.1 %, 70.0 %となり、ATP 濃度が下がるにつれて再結合確率が増加した (図 4.17)。

N-head は Biased binding メカニズムのみによってステップすると考えられ、その再結合確率が ATP 濃度によらず平均 9.9 %に抑えられたことから、Biased binding メカニズムによって再結合の阻害を説明できることが示された。一方、Biased diffusion メカニズムのみによってステップすると考えられる C-head では、再結合確率は ATP 飽和条件でも 34.2 %と N-head の場合よりも高く、また ATP 濃度の減少に伴って増大した。ATP 濃度が高いほど C-head が前方の結合部位へ結合しやすくなるという結果は、微小管に結合したN-headのネックリンクカードッキングに伴うパワーstrokeが浮いた C-head の前方結合部位への結合を促進することを裏付けるものである。しかし、後ろ結合部位への再結合を抑制するメカニズム不十分であることが示唆される。

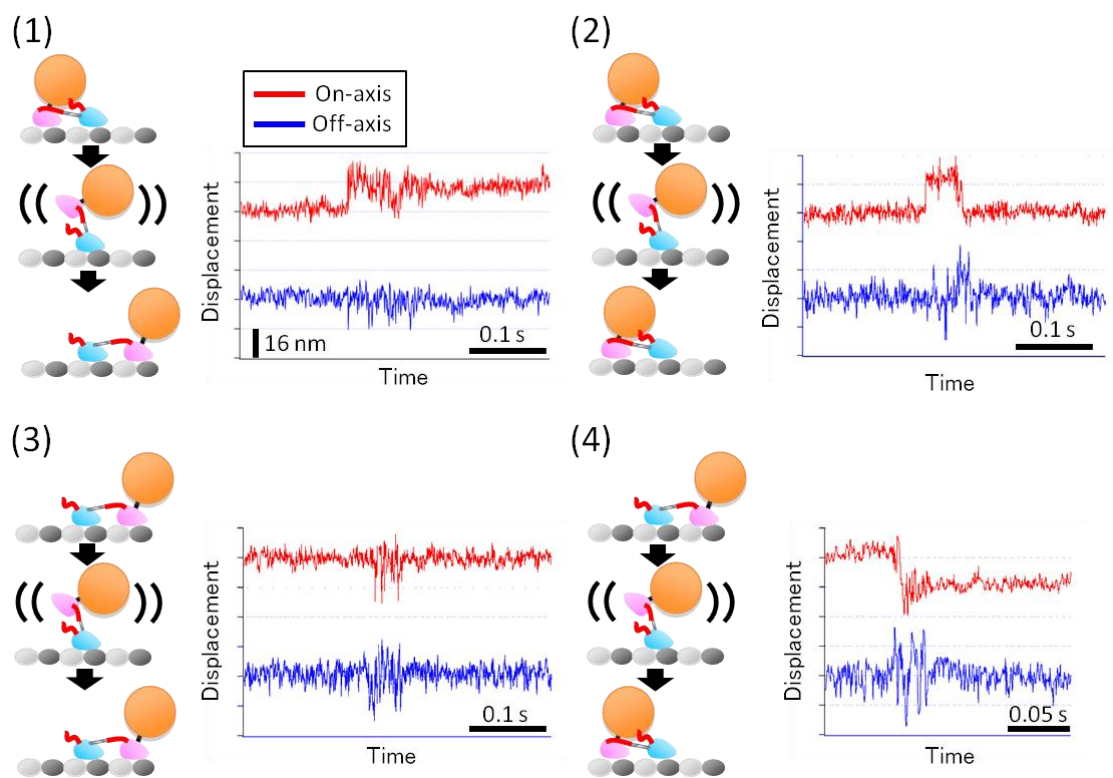


図 4.14: 4 種の Unbound 状態から Bound 状態への遷移過程

(1)後ろ頭部が解離したあと、前方の結合部位に結合（前方ステップ）,(2)後ろ頭部が解離したあと、同じ結合部位に再結合,(3)前頭部が解離したあと、同じ結合部位に再結合,(4)前頭部が解離したあと、後方の結合部位に結合（バックステップ）の各種の模式図とトレース例

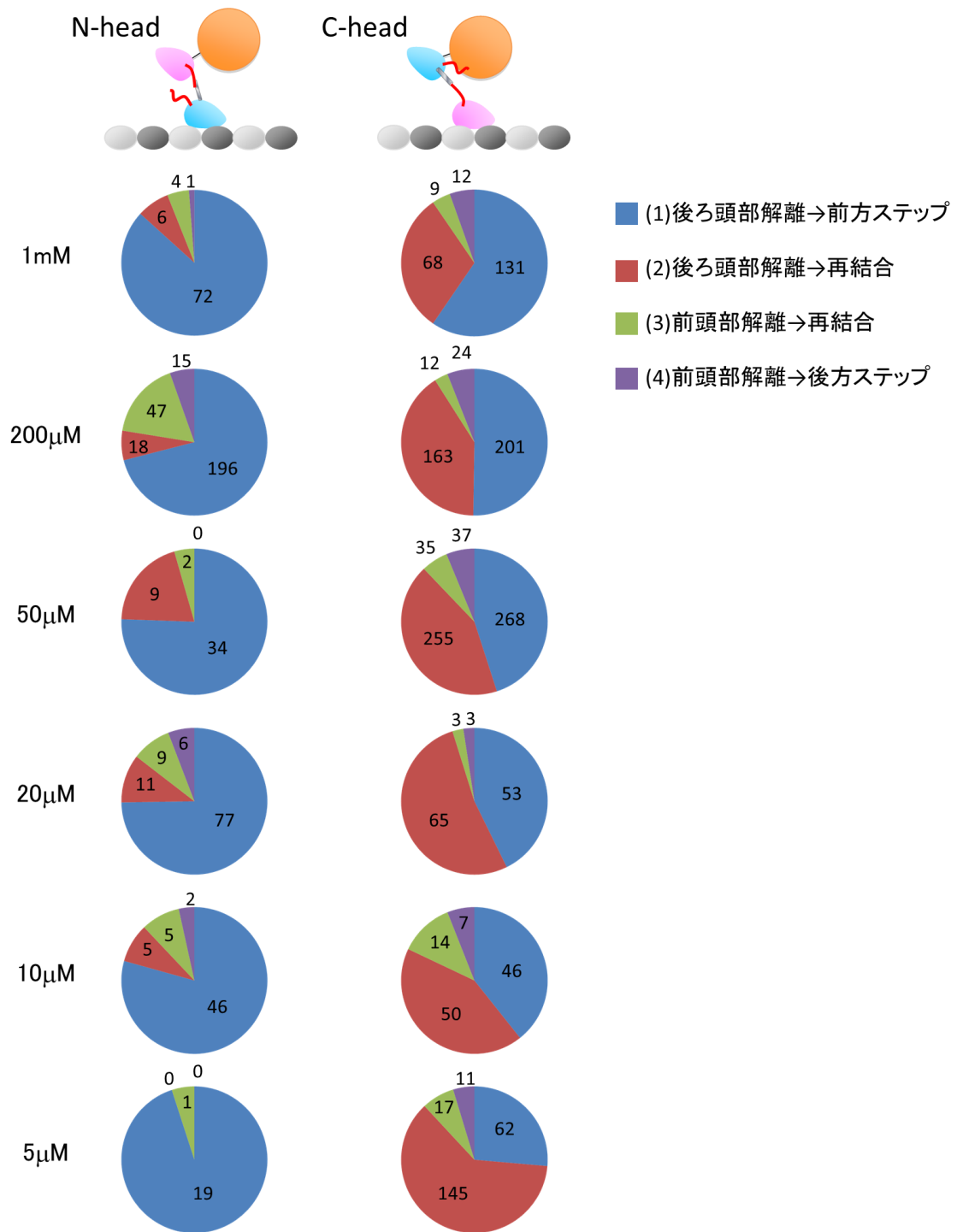


図 4.15: Unbound 状態からの遷移の分類分け

円グラフ上の数字はそれぞれの Unbound 状態から Bound 状態への遷移が観察された回数

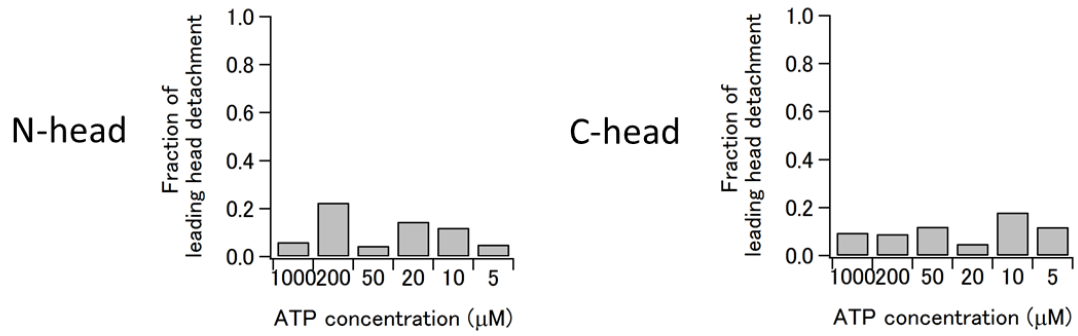


図 4.16: 前頭部が解離する割合

(3) + (4) / ((1) + (2) + (3) + (4)) を計算することにより求めた。

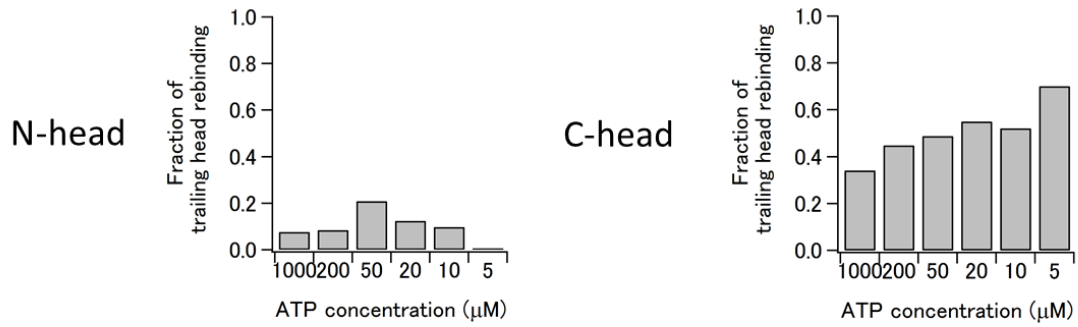


図 4.17: 浮いた後ろ頭部が同じ結合部位に再結合する確率

(2) / ((1) + (2)) を計算することにより求めた

4.4 微小管への結合状態と解離状態の持続時間

前節において、N-head では浮いた頭部の後ろの結合部位への再結合が 10 %程度に抑制されている一方で、C-head では ATP 濃度が高くなるほど前方へステップする確率が上がるものの、ATP 飽和条件でも 34.2 %と高い確率で再結合が起きていることが明示された。しかし、前方ステップの効率には再結合確率だけではなく後ろ頭部が微小管から解離してから前方結合部位に結合するまでにかかる時間も依存する。そこで本節ではタンデムキネシンの N-head および C-head の Bound 状態および Unbound 状態での持続時間を求めた。

N-head の Unbound 状態および Bound 状態の持続時間（それぞれ τ_{unbound} , τ_{bound} ）を各 ATP 濃度で測定し（図 4.18A）、ヒストグラムを作成した。Unbound 状態は解離した後ろ頭部が前方にステップした場合、解離した後ろ頭部が後方に再結合した場合、前頭部が解離した場合の 3 つに分類してそれぞれの場合でヒストグラムを作成した。前方ステップした場合の Unbound 状態のヒストグラムは指数関数でフィッティングでき、時定数は 1 mM, 200 μM , 50 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM ATP 条件下においてそれぞれ 4.2 ± 0.4 ms, 4.0 ± 0.2 ms, 3.1 ± 0.3 ms, 3.6 ± 0.4 ms, 2.7 ± 0.3 ms, 2.7 ± 0.3 ms（平均値 \pm フィッティングエラー）となった（図 4.18B）。N-head が解離したあと前方へステップするときにかかる時間には ATP 濃度依存性は見られず、その平均値は 3.4 ms となった。各 ATP 濃度における N-head が前方ステップするときの Unbound 状態の持続時間を野生型二量体の Unbound 状態の ATP 非依存的過程の持続時間（ 2.34 ± 0.09 ms [Isojima, 2013]）と t 検定によって比較した。その結果 t 値は 3.94 となり、自由度 5 の 5 %水準値 2.57 よりも高くなったことから N-head の前方ステップは ATP 結合後の野生型二量体よりも有意に遅いことが明らかになった。この結果は N-head の前方への拡散運動には野生型の二量体の場合よりもやや長い時間がかかることを意味しており、N-head では拡散運動を前方に促進する力がないために野生型二量体よりも前方ステップにやや時間がかかることを示唆しているが、その差は 1 ms 程度であり、解離速度も含めたステップ全体にかかる時間と比べると大きな影響ではないと考えられる。後ろ頭部の再結合や、前頭部が解離した場合の Unbound 状態の持続時間はデータ数が少ないためフィッティングすることができなかったが、ヒストグラムの k 時定数は 1 mM, 200 μM , 50 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM ATP 条件下においてそれぞれ 97 ± 6 ms, 127 ± 2 ms, 178 ± 24 ms, 245 ± 18 ms, 205 ± 14 ms, 308 ± 41 ms（平均値 \pm フィッティングエ

ラー) となり、ATP 濃度依存性が見られた (図 4.18B)。N-head の Bound 状態は後ろ頭部である C-head の Unbound 状態を含むため、N-head の Bound 状態が ATP 濃度依存性を示した原因は、C-head の再結合確率が ATP 濃度を下げるにつれて上昇し、そのため持続時間が長くなったと説明することができる (図 4.19)。

続いて C-head についても Unbound 状態の持続時間を各 ATP 濃度で測定し、ヒストグラムを作成した。N-head の場合と同様に、Unbound 状態は解離した後ろ頭部が前方にステップした場合、解離した後ろ頭部が後方に再結合した場合、前頭部が解離した場合の 3 つに分類した。データ数の少ない 20 μ M ATP 条件下の前頭部解離を除き、いずれの場合もヒストグラムは指数関数でフィッティングできた。前方ステップの場合では時定数は 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下においてそれぞれ 3.1 ± 0.2 ms, 1.9 ± 0.1 ms, 1.7 ± 0.1 ms, 1.9 ± 0.1 ms, 2.4 ± 0.1 ms, 3.1 ± 0.5 ms (平均値 \pm フィッティングエラー) となり、後方への再結合の場合では時定数はそれぞれ 3.5 ± 0.2 ms, 3.1 ± 0.2 ms, 2.7 ± 0.1 ms, 3.2 ± 0.1 ms, 3.1 ± 0.3 ms, 4.2 ± 0.4 ms、前頭部が解離した場合には 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下においてそれぞれ 4.5 ± 0.7 ms, 1.8 ± 0.2 ms, 4.1 ± 0.3 ms, 3.3 ± 0.4 ms, 3.8 ± 0.4 ms (図 4.20) となった。前方ステップ、後ろ頭部の再結合、前頭部の解離のいずれの場合でもステップに要する時間に ATP 濃度依存性は見られず、平均値はそれぞれ 2.4 ms, 3.3 ms, 3.5 ms となった。この結果は C-head の前方へのステップに要する時間に微小管に結合した N-head への ATP 結合およびネックリンカードッキングは無関係であることを示唆しており、後ろ頭部の C-head は解離したあと、低 ATP 条件でも N-head のネックリンカードッキングを待たずに容易に後方へ再結合できることが示唆された。

また、N-head の場合と同様にそれぞれの Unbound 状態の持続時間を野生型二量体の Unbound 状態の ATP 非依存的過程の持続時間と t 検定によって比較した。前方ステップの場合は $t = 0.04$ 、後ろ頭部の再結合の場合は $t = 4.61$ 、前頭部の解離の場合は $t = 2.47$ となり、自由度 5 (前頭部の解離では 4) の 5% 水準値は 2.57 (2.77) であるため、C-head のステップにかかる時間は前方ステップの場合は野生型二量体と有意差を持たず、後ろ頭部の再結合では有意な差を持つことが明らかになった。N-head とは異なり C-head の前方ステップにかかる時間が ATP 結合後の野生型二量体と有意差を持たないことから、C-head や野生型二量体においてはネックリンカーがドッキングすることで拡散運動による頭部の前方への移動が促進されていることが示唆される。一方頭部が後方に結合する場合には N-head の前方ステップと同様に拡散運動はバイアスを

受けないため前方ステップの場合よりもやや遅いと考えられる。前頭部が解離した場合は t 値は中間的な値となったが、これは前頭部の解離には前方ステップと後方ステップがどちらも含まれているためであると考えられる。

C-head の Bound 状態は直前の Unbound 状態が前方ステップである場合と後方への再結合である場合を分類してヒストグラムを作成した (図 4.21A)。C-head が前方ステップした直後は N-head が後ろ頭部であり、そのあと N-head が解離して前方にステップし C-head が後ろ頭部となったあと C-head が解離するため Bound 状態の持続時間には N-head の前方ステップが含まれるが、一方 C-head が後方へ再結合したときは C-head が後ろ頭部であるため、Bound 状態の持続時間に N-head の前方ステップは含まれないためである (図 4.22)。再結合後の Bound 状態の持続時間をすべての ATP 濃度で測定しヒストグラムを作成したところ、各 ATP 濃度でヒストグラムは単一の指数関数でよくフィッティングできた。時定数は 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下においてそれぞれ 35 ± 1 ms, 40 ± 2 ms, 39 ± 1 ms, 60 ± 6 ms, 85 ± 10 ms, 101 ± 7 ms (平均値 \pm フィッティングエラー) となった (図 4.21B)。逆数をミカエリス・メンテン式でフィッティングすることで ATP 濃度依存的な速度定数 k_1 と ATP 濃度非依存的な速度定数 k_2 を求めたところ、 $k_1 = 2.4 \pm 0.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_2 = 28.4 \pm 1.5 \text{ s}^{-1}$ となった (図 4.21C)。再結合後の C-head の解離時間に ATP 濃度依存性が見られたことから、再結合した C-head はヌクレオチドフリーの状態にあり、その後再び解離するためには ATP の結合が必要であることが示された。 k_1 が野生型二量体の Unbound 状態の持続時間から求められた値 ($6.2 \pm 0.9 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Isojima, 2016]) の半分以下であり、この結果は後ろ頭部の状態で微小管に結合している C-head では野生型二量体よりも ATP に対する親和性が低いことを示唆している。これは C-head ではネックリンカーが前方に引っ張られていないため、ATP の結合が安定化されていないという考えを裏付けるものである。

次に、前方ステップ後の C-head の Bound 状態の持続時間のヒストグラムを各 ATP 濃度で求めたところ、5 μ M ATP 条件を除く各 ATP 濃度でピークを一つ持つ山型の分布が見られた。これは、2つの律速過程を含むことを示唆しており、それぞれ、後ろ頭部である N-head のステップとその後後ろ頭部となった C-head のステップの2つの過程を含むと考えられる。そこでこれらの分布を二重指数関数

$$P(t) = A[\exp(-t/\tau_1) - \exp(-t/\tau_2)]$$

を用いてフィッティングしたところ、単一の指数関数よりもうまくフィッティングする

ことができた。ここで、時定数 τ_1 は再結合後の Bound 状態の持続時間をミカエリス・メンテン式でフィッティングして求めた速度定数から計算した値を代入した。もうひとつの時定数 τ_2 は 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M ATP 条件下においてそれぞれ 11.4 ± 2.8 ms, 10.0 ± 2.5 ms, 5.6 ± 0.6 ms, 10.1 ± 1.1 ms, 7.4 ± 0.7 ms (平均値 \pm フィッティングエラー) となった (図 4.21B)。時定数 τ_2 に ATP 濃度依存性はなく、平均値は 8.9 ms であった。時定数 τ_2 は N-head のステップに要する時間であると考えられたが、ATP 濃度依存性を示さないという結果は、N-head の微小管からの解離と前方ステップに ATP 濃度依存的な過程は含まれないことを示唆している。これは N-head が後ろ頭部の状態では野生型二量体と同様にすでに ATP が結合しており、その後の N-head の解離は ATP 加水分解とリン酸解離のみが律速であることを示唆するものである。一方、後ろ頭部である C-head の解離が ATP 依存性を示したという結果は C-head が後ろ頭部になった直後はまだ C-head に ATP が結合していないことを表しており、低濃度の ATP 条件下では浮いた N-head は微小管に結合した C-head に ATP が結合する前に前方へステップすることを示すものである。また、この結果から N-head および C-head における ATP 結合後の ATP 加水分解およびリン酸解離に要する時間を見積もることができる。C-head における ATP 結合後解離するまでの時間は解離速度の ATP 濃度非依存的な速度定数 $k_2 = 28.4 \pm 1.5$ s⁻¹の逆数 35.2 ± 1.9 ms であるため、N-head における ATP が結合後解離するまでの時間 8.9 ± 0.7 ms よりも 4 倍程度長い。N-head が C-head よりも ATP 結合後の解離が遅い理由は、ネックリンカーは前方に引っ張られているため ATP 結合が安定化され、加水分解反応が促進されるというモデルを裏付けるものである。

リンカーを金コロイド粒子で標識した場合の運動トレースは時間の速いステップと遅いステップを交互に繰り返していた。これは速い N-head のステップと遅い C-head のステップを交互に取りながら Hand-over-hand で運動していることを表している。1 mM, 20 μ M ATP 条件下で速いステップと遅いステップそれぞれの持続時間を測定し、ヒストグラムを作成したところ、いずれのヒストグラムも単一の指数関数でフィッティングできた。時定数は速いステップでは 1 mM, 20 μ M ATP 条件下でそれぞれ 7.4 ± 0.3 ms, 10.1 ± 0.3 ms (平均値 \pm フィッティングエラー) であり、遅いステップではそれぞれ 42 ± 3 ms, 175 ± 20 ms であった (図 4.23)。速いステップでは ATP 濃度による違いが見られなかった一方、遅いステップでは ATP 濃度による違いが見られた。速いステップの持続時間は ATP 濃度に依存せず、また C-head の Bound 状態からフィッティ

ングによって求めた N-head のステップ時間 8.9 ± 0.7 ms と近いことから、速いステップは N-head のステップであると考えられる。一方の遅いステップは C-head のステップであると考えられるが、その持続時間は N-head の Bound 状態の持続時間よりも短くなった。この結果は、4.1 で述べたようにリンカーにつけた金コロイドによって後ろ頭部である C-head の前方へのブラウン運動が阻害され、再結合確率が上昇したためと説明することができる。

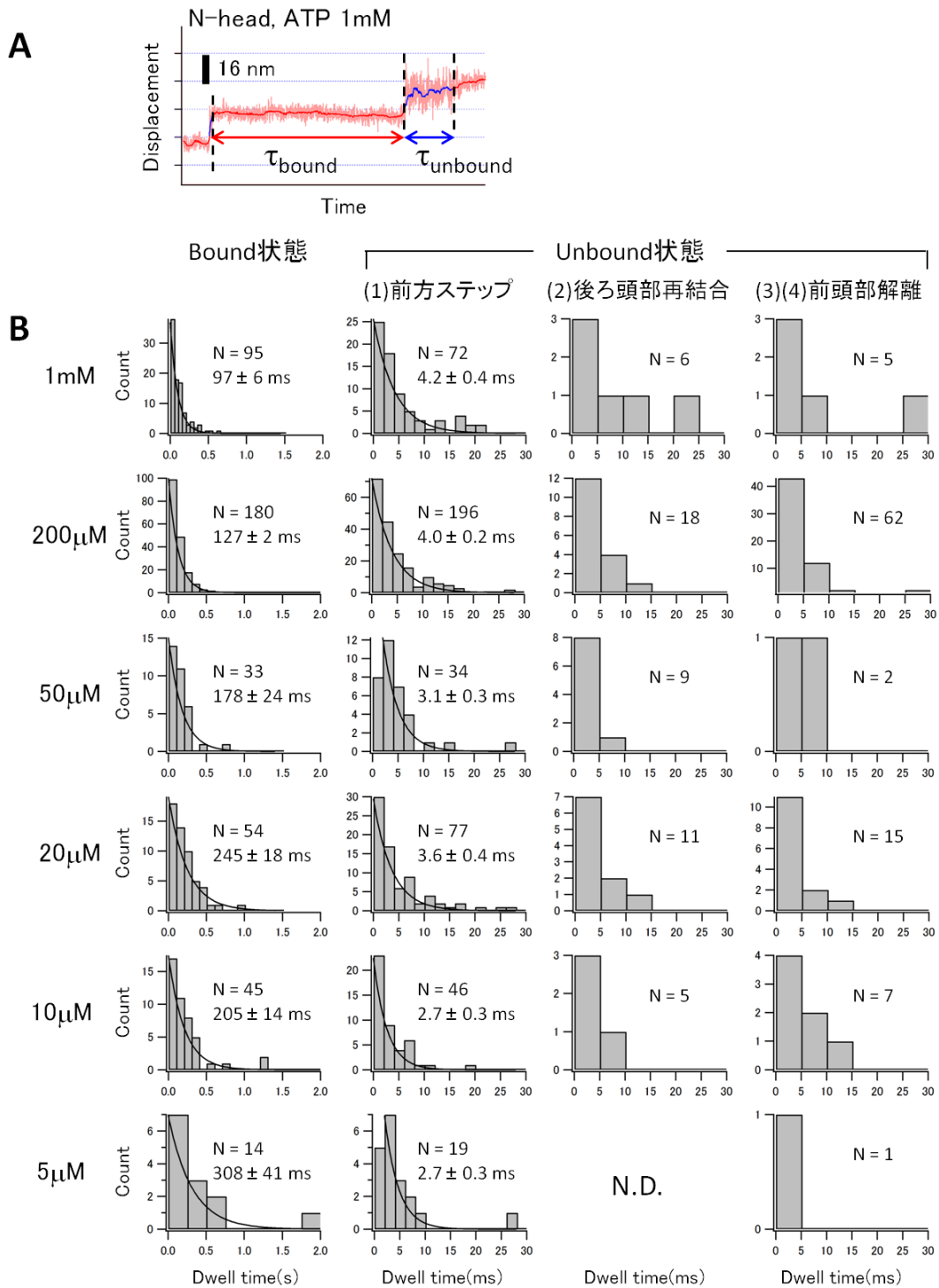


図 4.18: N-head の Unbound および Bound 状態の持続時間

(A) 1 mM ATP 条件下における持続時間の測定例。(B) 各 ATP 濃度における N-head の Bound 状態および Unbound 状態の持続時間のヒストグラム。Bound 状態および前方ステップした場合の Unbound 状態のヒストグラムを指数関数でフィッティングし時定数を求めた。

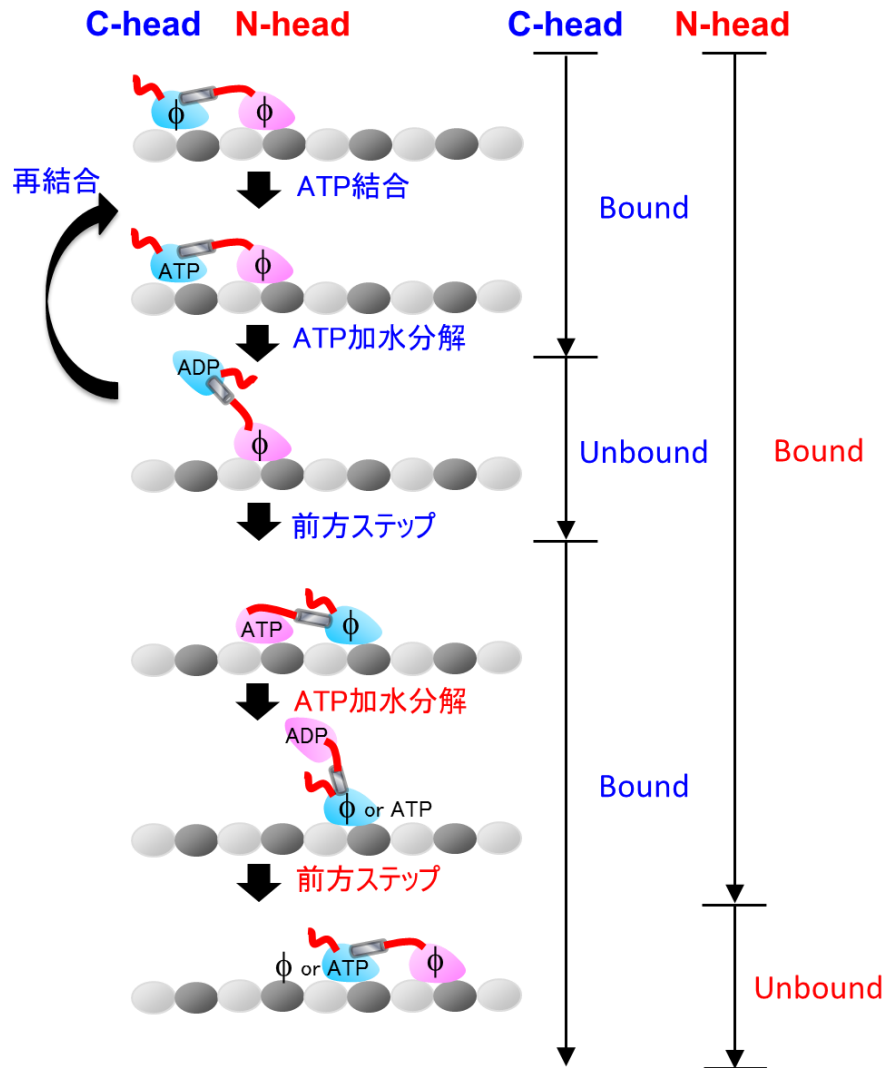


図 4.19: N-head の Bound 状態と C-head の結合解離との対応

N-head の Bound 状態は C-head が後ろ頭部の状態から解離した Unbound 状態を含む。そのため、N-head の Bound 状態の ATP 濃度依存性は、C-head の再結合確率の ATP 濃度依存性を反映していると説明することができる。

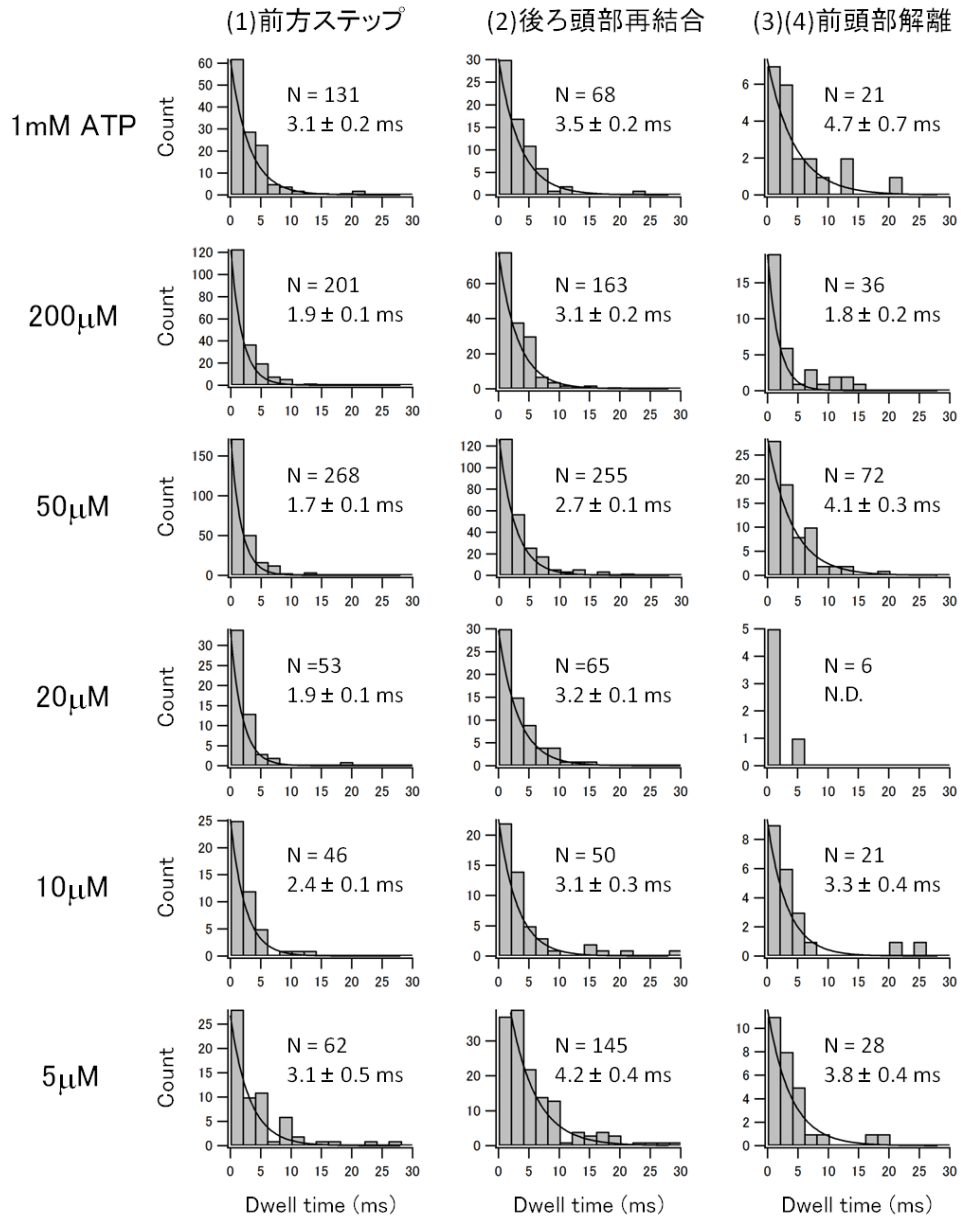


図 4.20: C-head の Unbound の持続時間

各 ATP 濃度における C-head の Unbound 状態の持続時間のヒストグラム。ヒストグラムを指数関数でフィッティングし時定数を求めた。

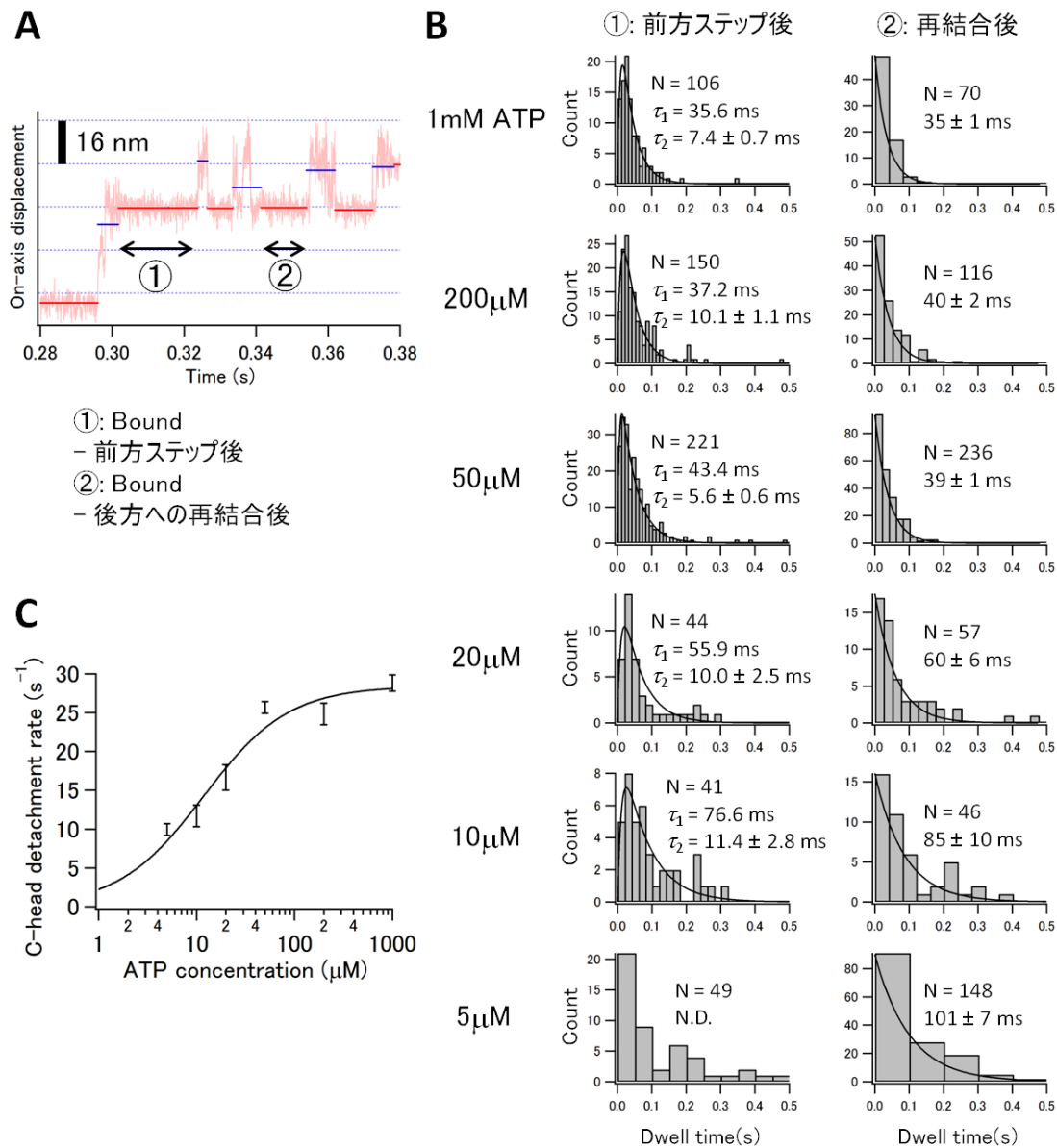


図 4.21: C-head の Bound 状態の持続時間

(A) Bound 状態を①前方ステップ後と②再結合後に分けてそれぞれの持続時間を測定した。
 (B) ②ではヒストグラムは指数関数でフィッティングでき、フィッティングにより時定数を求めた。①は一つの時定数に(C)で求めた速度定数から計算した値を代入した二重指数関数でフィッティングし、もう一方の時定数を求めた。
 (C) 頭部の解離速度 (再結合後の Bound 状態の持続時間の逆数) と ATP 濃度の関係をプロットした (平均値±フィッティングエラー)。ミカエリス・メンテン式でフィッティングすることにより $k_{\text{cat}} = 28.4 \pm 1.5 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 11.7 \pm 2.6 \text{ } \mu\text{M}$ (平均値±フィッティングエラー) を得た。

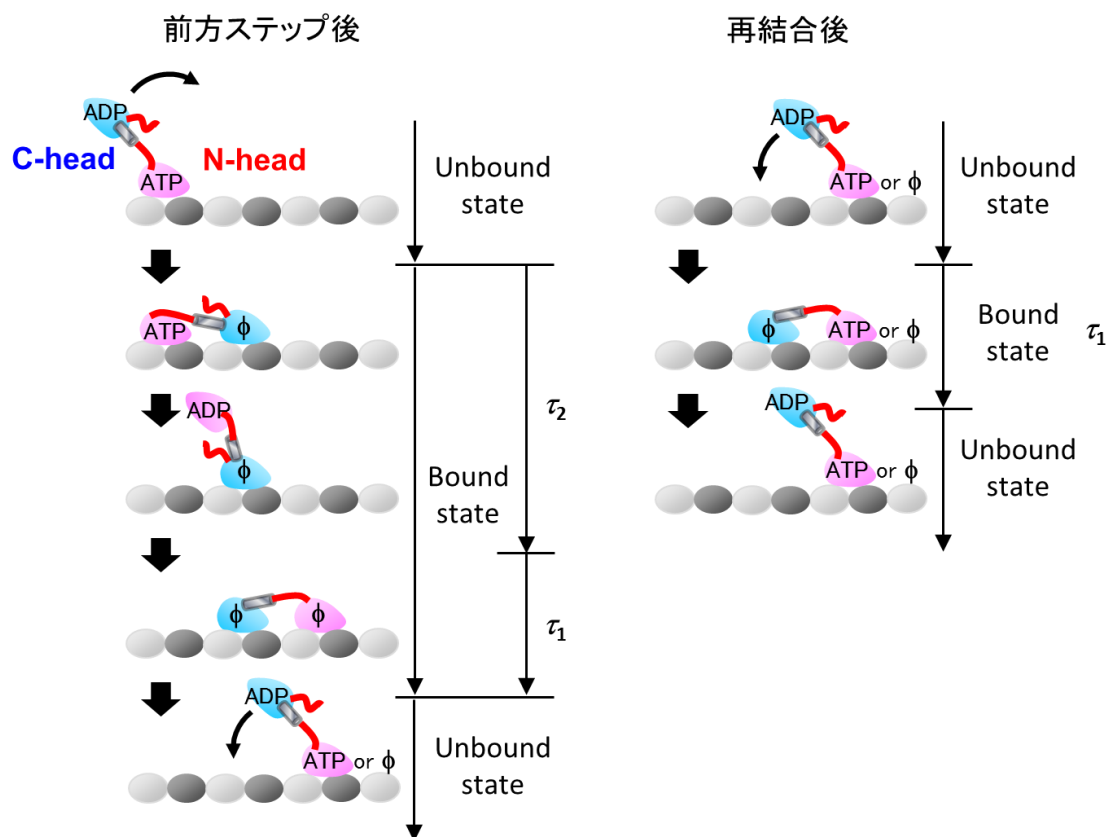


図 4.22: C-head の前方ステップ直後と再結合後の Bound 状態の違い

直前の Unbound 状態が前方ステップである場合、C-head の Bound 状態の持続時間には N-head のステップ時間 τ_2 が含まれるが、再結合である場合 τ_2 は含まれない。

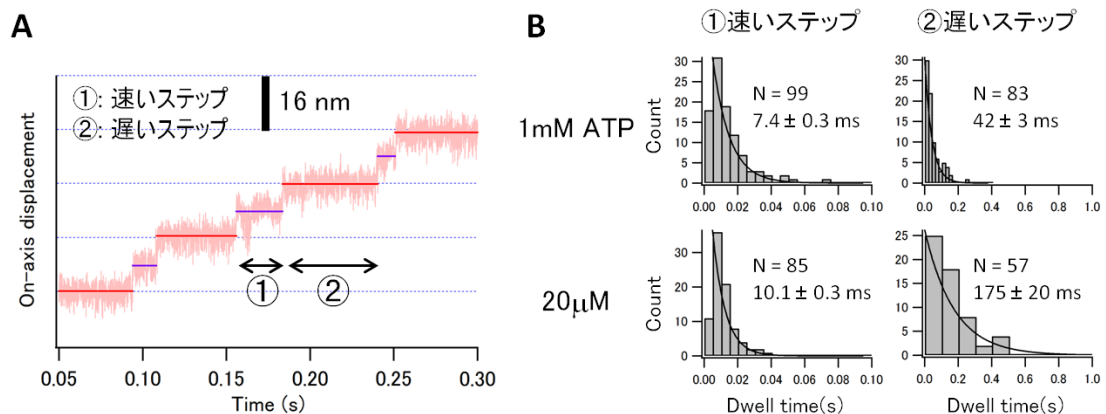


図 4.23: リンカー標識で観察されたステップの持続時間

(A) リンカー標識で観察されたステップを速いステップ (①; 赤) と遅いステップ (②; 紫) に区別しそれぞれの持続時間を求めた。(B) それぞれのステップの持続時間のヒストグラム。ヒストグラムを指数関数でフィッティングし時定数を求めた。

4.5 解離状態での頭部のブラウン運動

ここまでの結果から、タンデムキネシンの N-head は ATP 濃度によらず高い確率で前方にステップし、その際 Unbound 状態の持続時間は 3 ms 程度であることが明らかになった。しかしこのような選択的前方ステップをもたらす要因には Biased binding メカニズムだけではなく、N-head の拡散運動に C-head と比べて強い前方へのバイアスがかかっている前方の結合サイトにのみアクセスしやすくなっている可能性が考えられる。そこで私は N-head および C-head の Unbound 状態の 2 次元分布を作成し比較を行った。

まず N-head が前方ステップした場合の Unbound 状態について直前の Bound 状態の On-axis および Off-axis の平均値を計算し、差を取ることで Bound 状態を基準とした Unbound 状態における頭部の変位を求めた。Bound 状態を基準とした頭部の変位を 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下の全てのトレースで集積し、2 次元ヒストグラムを作成した (図 4.24)。いずれの 2 次元ヒストグラムでも Unbound 状態の分布は前方結合サイト(16, 0)および後方結合サイト(0, 0)にかかっていることから、Unbound 状態の N-head はいずれの ATP 濃度でも前方結合サイトおよび後方結合サイトにアクセスできることが示唆される。On-axis, Off-axis それぞれで分布の平均値を計算したところ On-axis では 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下でそれぞれ 13.7 ± 9.9 nm, 13.2 ± 7.0 nm, 15.6 ± 13.2 nm, 13.1 ± 9.9 nm, 13.6 ± 8.3 nm, 15.6 ± 8.2 nm (平均値 \pm 標準偏差)、Off-axis ではそれぞれ -1.6 ± 11.8 nm, -1.9 ± 10.4 nm, -3.9 ± 10.4 nm, -1.8 ± 8.5 nm, -4.3 ± 10.6 nm, -3.7 ± 9.6 nm であった。Unbound 状態の分布に ATP 濃度依存性は見られず、平均値は On-axis では 14.1 ± 9.6 nm、Off-axis では -2.9 ± 10.2 nm であった (図 4.27)。

C-head の場合は後ろ頭部の再結合が多く見られるため、前方ステップした場合に加えて後ろ頭部が解離し再結合した場合でも Unbound 状態の頭部の変位を集積し、2 次元ヒストグラムを作成した (図 4.25: 前方ステップ、図 4.26: 後ろ頭部の再結合)。いずれの 2 次元ヒストグラムでも Unbound 状態の分布は前方結合サイトおよび後方結合サイトににかかっていることから、Unbound 状態の C-head はいずれの ATP 濃度でも前方結合サイトおよび後方結合サイトにアクセスできることが示唆される。前方ステップした場合の On-axis, Off-axis それぞれの分布の平均値を計算したところ On-axis では 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下でそれぞれ 16.6 ± 9.1 nm, 16.7

± 12.0 nm, 14.3 ± 9.8 nm, 18.3 ± 12.0 nm, 9.8 ± 9.6 nm, 13.7 ± 14.3 nm (平均値 \pm 標準偏差)、Off-axis ではそれぞれ -2.7 ± 9.7 nm, -3.6 ± 10.0 nm, -2.9 ± 11.3 nm, -4.6 ± 10.6 nm, -5.7 ± 9.7 nm, -4.8 ± 12.3 nm であった (図 4.27)。Unbound 状態の分布にはやや ATP 濃度依存性が見られ、ATP 濃度が高いほど分布が微小管プラス端方向に偏っていた。各 ATP 濃度で分布の平均値を平均すると On-axis では 14.9 ± 11.1 nm、Off-axis では -4.0 ± 10.6 nm であった。後ろ頭部が再結合した場合でも同様に On-axis, Off-axis それぞれの分布の平均値を計算したところ On-axis では 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下でそれぞれ 11.4 ± 9.2 nm, 12.1 ± 10.5 nm, 11.1 ± 9.4 nm, 15.3 ± 11.8 nm, 7.6 ± 10.3 nm, 10.0 ± 11.0 nm (平均値 \pm 標準偏差)、Off-axis ではそれぞれ -3.9 ± 11.1 nm, -3.0 ± 9.8 nm, -2.3 ± 9.1 nm, -4.8 ± 11.3 nm, -3.0 ± 10.6 nm, -4.1 ± 11.0 nm であった (図 4.27)。Unbound 状態の分布にはやや ATP 濃度依存性が見られ、ATP 濃度が高いほど分布が微小管+単方向に偏っていた。各 ATP 濃度で分布の平均値を平均すると On-axis では 11.2 ± 10.4 nm、Off-axis では -3.5 ± 10.5 nm であった。

2次元ヒストグラムの平均値を N-head および C-head で比較すると前方ステップした場合には On-axis 方向の平均値に大きな違いは見られない。このことから、N-head の拡散運動は C-head と比べて前にバイアスを受けてはいないことが示唆される。また、Off-axis 方向では C-head の方が右側にやや大きく変位している。これは N-head が C-head の N 末端領域につながっており、N 末端領域はネックリンカーの付け根よりも上部にあり (図 1.22) 左方向への拡散の自由度が高いためであると考えられる。また、C-head が前方ステップする場合と後方へ再結合する場合で分布の平均値を比較すると、再結合する場合の方が 3.7 nm 後方に分布している。C-head は ATP 濃度が高くネックリンカーがドッキングしやすい条件ほど前方へステップしやすいため、前方ステップ時と再結合時の Unbound 状態のずれはドッキングによる拡散運動のバイアスを反映したものであると考えることができる。

さらに前方結合サイトと後方結合サイトへのアクセス頻度を調べ、N-head および C-head で比較を行った。N-head の拡散運動に C-head の場合よりも前方へアクセスしやすいバイアスがかかっているならば N-head の前方アクセス頻度は C-head よりも高く後方アクセス頻度は C-head よりも低いはずである。頭部が前方結合サイト(16, 0)あるいは後方結合サイト(0, 0)を中心とした半径 5 nm の円内に入った場合をアクセスとみなし (図 4.28A)、N-head 前方ステップ、C-head 前方ステップ、C-head 再結合についてそれぞれ各 ATP 濃度でアクセス頻度およびその比を計算した (図 4.28B)。なお、

円の半径は **Bound** 状態の標準偏差から決定した。**N-head** 前方ステップでは前方結合サイト、後方結合サイトともにアクセス頻度に **ATP** 濃度依存性は見られず、平均値はそれぞれ 13.1 %, 5.3 %と前方へのアクセス頻度の方が高かった。**C-head** 前方ステップではアクセス頻度 **ATP** 濃度依存性が見られ、**ATP** 濃度が高いほど前方へアクセスする割合が高かった。前後の結合サイトへのアクセス頻度の平均値を計算するとそれぞれ 13.3 %, 5.5 %と **N-head** が前方ステップする場合と近い値となった。**C-head** が後方へ再結合する場合はアクセス頻度の **ATP** 濃度依存性は不明瞭であったが、前後の結合サイトへのアクセス頻度の平均値を計算すると 10.9 %, 9.0 %と前方ステップする場合よりも前へアクセスしづらく後ろへアクセスしやすい状態になっていることが明らかになった。

以上の結果から、**N-head** の **Unbound** 状態は前方にややバイアスを受け前方結合サイトにアクセスしやすくなっているものの、それは **C-head** の場合と同程度であることが明らかになった。したがって、**N-head** が **C-head** とは異なり前方へ高い確率でステップする原因は拡散運動のバイアスではなく、**Biased binding** メカニズムであることが強く示唆される。また、**C-head** の **Unbound** 状態は前方ステップした場合の方が再結合した場合よりも前方にバイアスを受けており前方結合サイトへアクセスしやすくなっていることは、**C-head** の拡散運動が **N-head** のネックリンカードッキングによって前方へバイアスを受けていることを示唆する結果である。また、**C-head** が前方ステップする場合の **Unbound** 状態は **ATP** 濃度が高いほど前方へバイアスを受けていて前方結合サイトサイトにアクセスしやすくなっているが、これは **Unbound** 状態の分布が **ATP** 濃度に依存しない野生型二量体 (図 1.18 [Isojima, 2016]) とは異なる結果である。これは野生型二量体ではネックリンカーがドッキングすると浮いた頭部は即座に前方へ結合するためドッキング後の **Unbound** 状態はほとんど見られない一方、タンデムキネシンの **C-head** ではドッキング後の **Unbound** 状態が見られることを意味しており、**C-head** はドッキング後でもしばしば後方へ再結合することを示唆している。

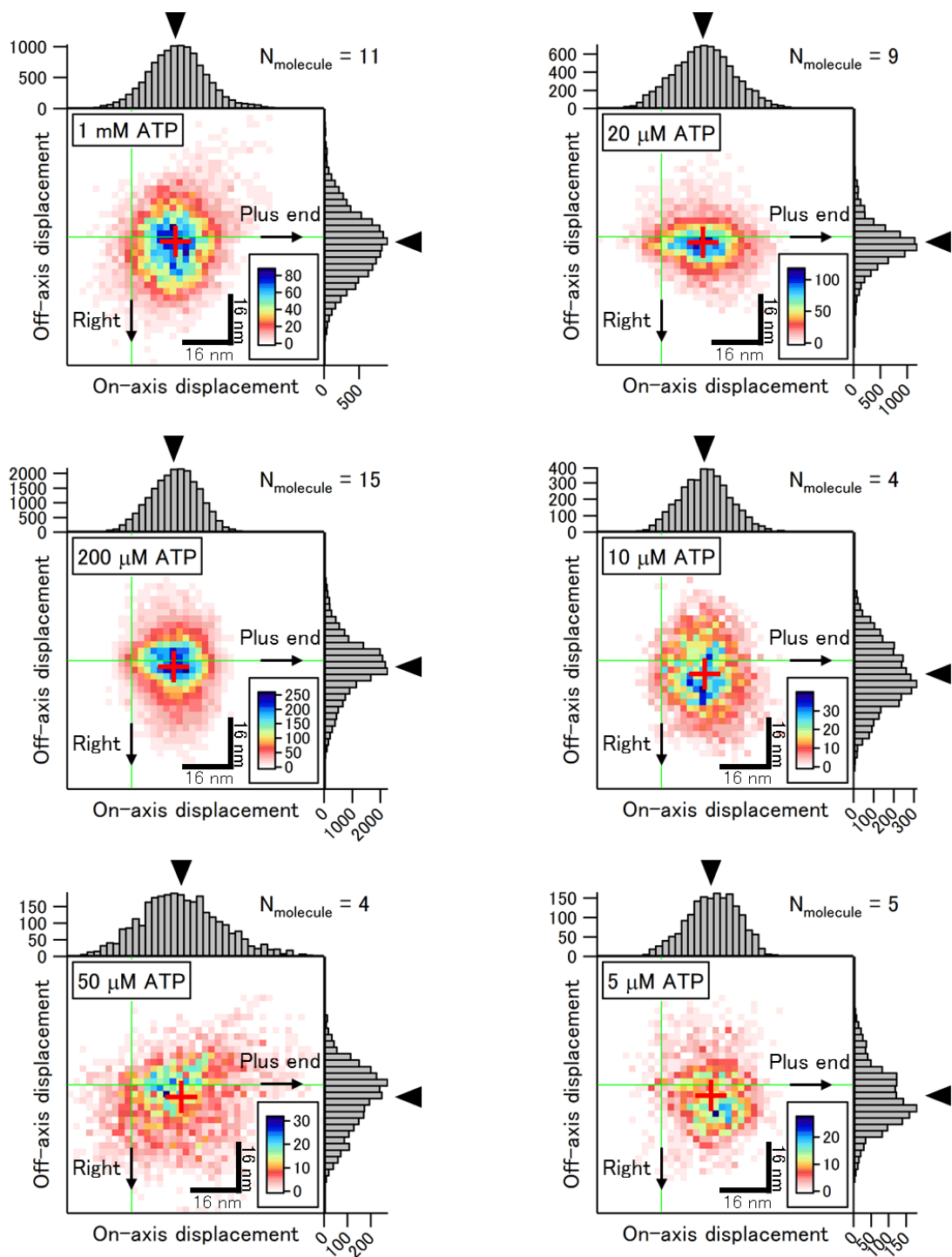


図 4.24: N-head が前方ステップする場合の Unbound 状態の二次元ヒストグラム

緑線は直前の Bound 状態の平均位置を表す。矢印は On-axis, Off-axis の平均位置をマーク
ー (赤) は二次元分布の平均位置を表す。

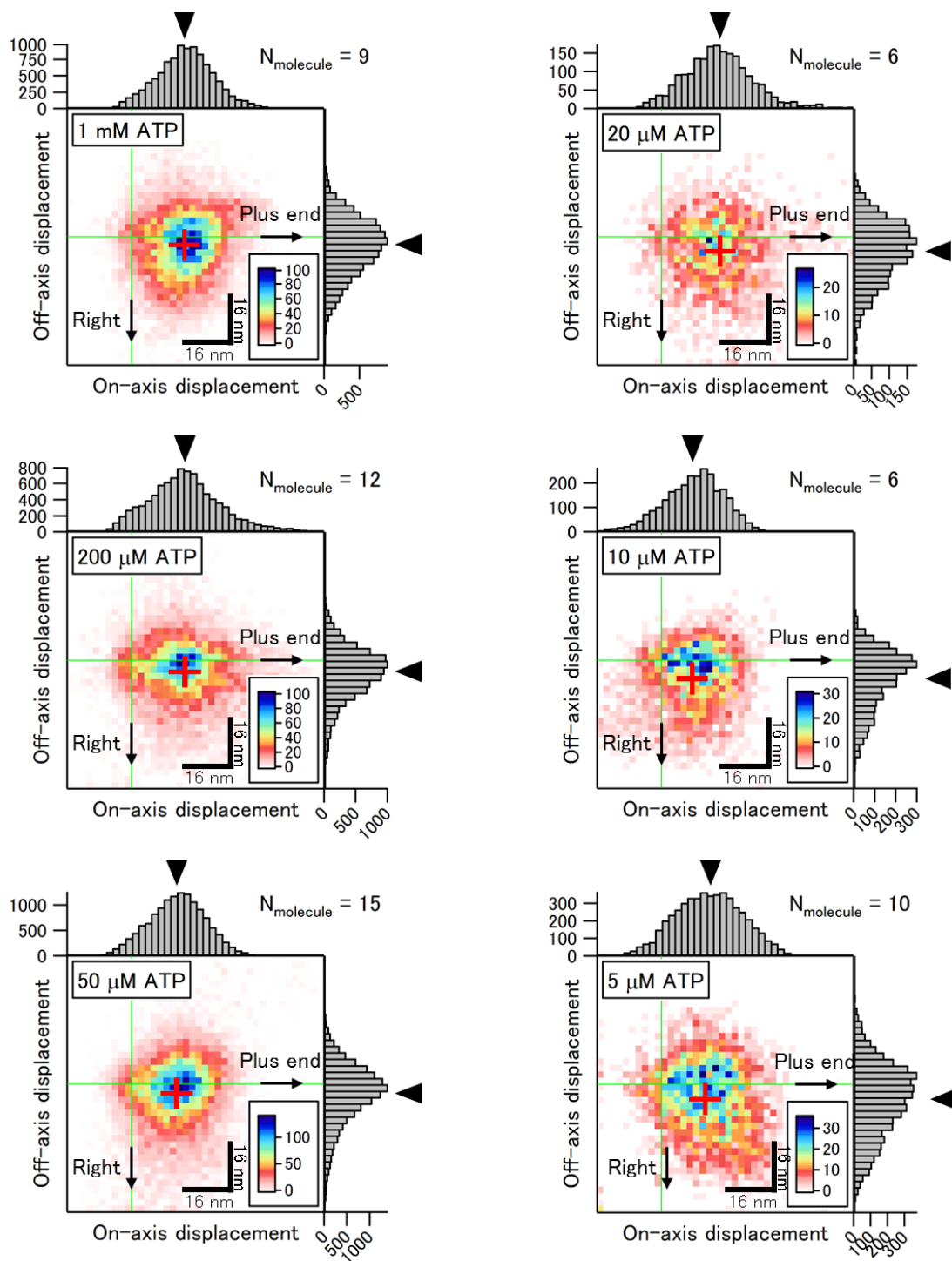


図 4.25: C-head が前方ステップする場合の Unbound 状態の二次元ヒストグラム

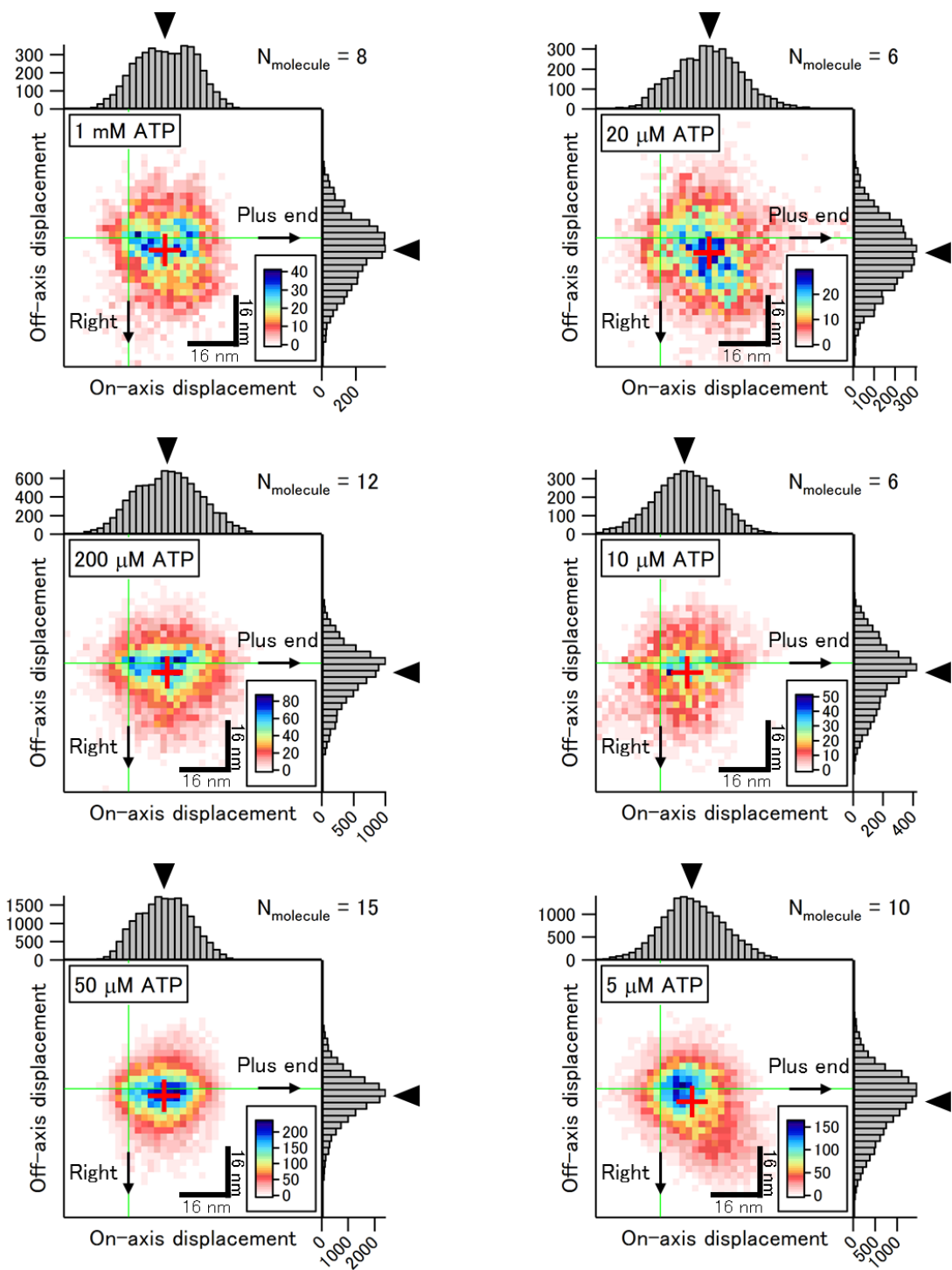


図 4.26: C-head が後方に再結合する場合の Unbound 状態の二次元ヒストグラム

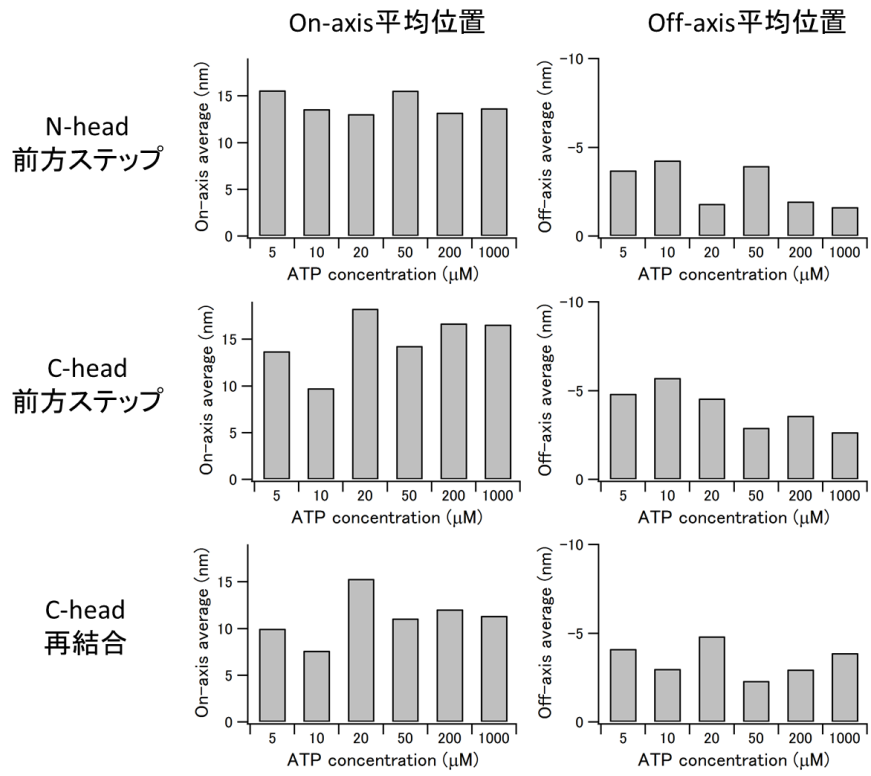


図 4.27: Unbound 状態の二次元ヒストグラムの平均位置

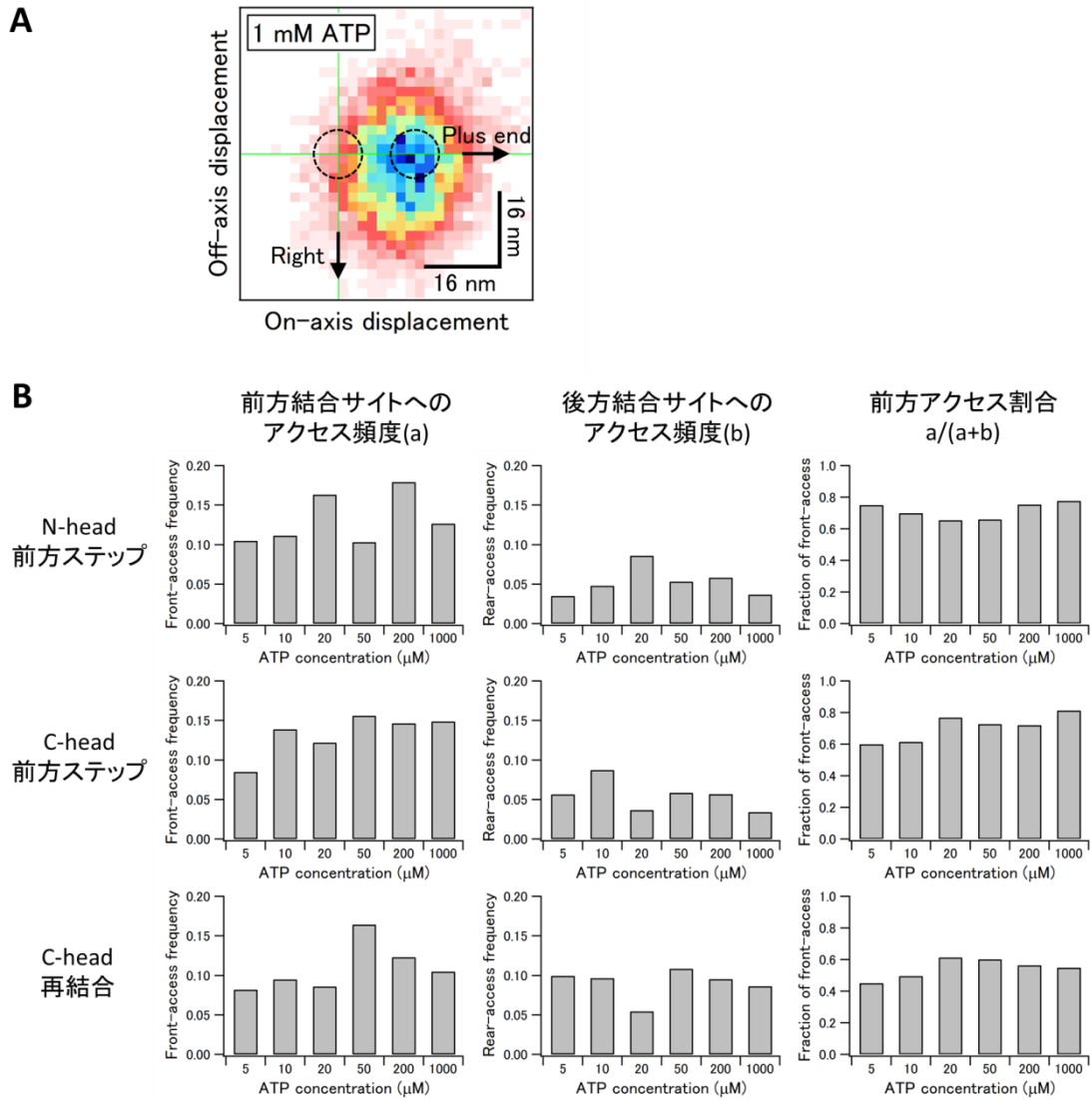


図 4.28: 前後の結合サイトへのアクセス頻度

(A)前方結合サイト(16, 0)および後方結合サイト(0, 0)からそれぞれ半径 5 nm の円 (黒破線) 内に頭部が位置する場合をアクセスとみなし、それぞれの結合サイトへのアクセス頻度を計算した。(B)N-head 前方ステップ、C-head 前方ステップ、C-head 再結合のそれぞれの場合の前後の結合サイトへのアクセス頻度および前方アクセス割合。前方アクセス割合は前方結合サイトへのアクセス頻度と前後の結合サイトへのアクセス頻度の和の商を取ることで計算した。

4.6 ネックリンカー変異体タンデムキネシンの運動観察

タンデムキネシンの N-head の解離速度が ATP 濃度に依存しないことから、C-head は N-head へ ATP が結合しネックリンカーがドッキングしなければ前方にステップできないことが間接的に示された。しかし N-head のネックリンカードッキングと C-head ステップの関係は直接的にはわかっていない。そこで N-head のネックリンカーを一部アラニンに置換した変異体を用いて C-head の運動を観察した。この変異はネックリンカードッキングを阻害することが知られているため、変位の導入によってネックリンカードッキングを阻害された C-head の再結合頻度を測定することでネックリンカードッキングと C-head ステップの関係を明らかにし、ネックリンカーによる前方ステップの制御機構について明らかにすることができると考えられる。

タンデムキネシンの N-head のネックリンカーをアラニンに置換した変異体タンデムキネシンを作成した (図 4.29A)。C-head に金コロイド粒子を標識し、1 mM ATP 条件下でその運動を全反射暗視野顕微鏡で観察した。観察された輝点を二次元ガウス関数でフィッティングし、On-axis および Off-axis の時間変化を図示した (図 4.29B)。その結果、ネックリンカー変異体タンデムキネシンの運動速度は非常に遅く、後ろ頭部の再結合が頻繁に見られた。再結合確率を定量するために 2.2.3 の Unbound 状態検出アルゴリズムを用いて Unbound 状態を検出し、4.3 と同様の基準で 4 種類の Unbound 状態に分類した (図 4.29C)。その結果、後ろ頭部の状態から解離した頭部が後方の結合部位に再結合する確率 $(1)/((1)+(2))$ は 94.6 %と 100 %に近い高い確率で再結合することが明らかになった。これは野生型タンデムキネシンの C-head の再結合確率 34.2 %よりも顕著に高く、N-head のネックリンカーへの変異の導入によって C-head の前方ステップが阻害されることが明らかになった。また、再結合後の Bound 状態の持続時間、すなわち C-head の解離時間を測定しヒストグラムを作成したところ指数関数でフィッティングでき、その時定数は 29.4 ± 0.8 ms であった (図 4.29D)。これは野生型タンデムキネシンの C-head の解離時間 35 ± 1 ms に近い値であることから、ネックリンカー変異が C-head における ATP 加水分解に影響を与えないことが確かめられた。また、再結合した場合の Unbound 状態の持続時間を測定しヒストグラムを作成したところ同様に指数関数でフィッティングでき、その時定数は 5.2 ± 0.3 ms であった (図 4.29D)。これは野生型タンデムキネシンの再結合の Unbound 状態の持続時間 3.5 ± 0.2 ms よりも 1.5 倍程度長い。

さらに 4.5 と同様の方法で Unbound 状態の分布を集め、二次元ヒストグラムを前方ステップした場合と再結合した場合で分けて作成した (図 4.30A)。On-axis および Off-axis の平均値を計算したところ、前方ステップではそれぞれ 13.7 ± 10.2 nm, -8.0 ± 9.6 nm となり、再結合ではそれぞれ 12.0 ± 9.9 nm, -8.1 ± 10.5 nm となった (図 4.30B)。前方ステップの On-axis 方向の平均位置が 1 mM ATP 条件下の野生型タンデムキネシンの場合の 16.6 ± 9.1 nm よりも 3 nm 程度後方に位置しており、むしろ 5 mM ATP 条件下の 13.7 ± 14.3 nm に近い値であったことから、変異の導入によりネックリンカードッキングおよびそれに伴う頭部の拡散運動の前方シフトが抑えられていることが明らかになった。また、前方ステップと再結合のどちらの場合でも Off-axis 方向の平均位置が野生型タンデムキネシンの場合よりも 4 nm 程度右側に位置しているが、これはネックリンカーが頭部と相互作用しないために右側への拡散自由度が高いためであると考えられる。また、4.5 と同様の方法で前方結合サイトおよび後方結合サイトへのアクセス頻度を求めたところ、前方ステップではそれぞれ 7.0 %, 6.2 % となり、再結合ではそれぞれ 7.3 %, 7.6 % となった (図 4.30C)。この結果は前方へのアクセスバイアスが野生型タンデムキネシンの場合よりも減少していることを意味しており、ネックリンカーへの変異の導入により頭部の拡散運動の前方シフトが抑えられていることが示唆される。また、変異体タンデムキネシンでは前後の結合サイトへのアクセス頻度に違いがないにもかかわらず前方ステップが抑制されているという結果は、Unbound 状態の金コロイドの中心位置の二次元ヒストグラムは頭部の実際の位置を反映しておらず、Bound 状態と比べてやや前方を指している可能性が示唆される。

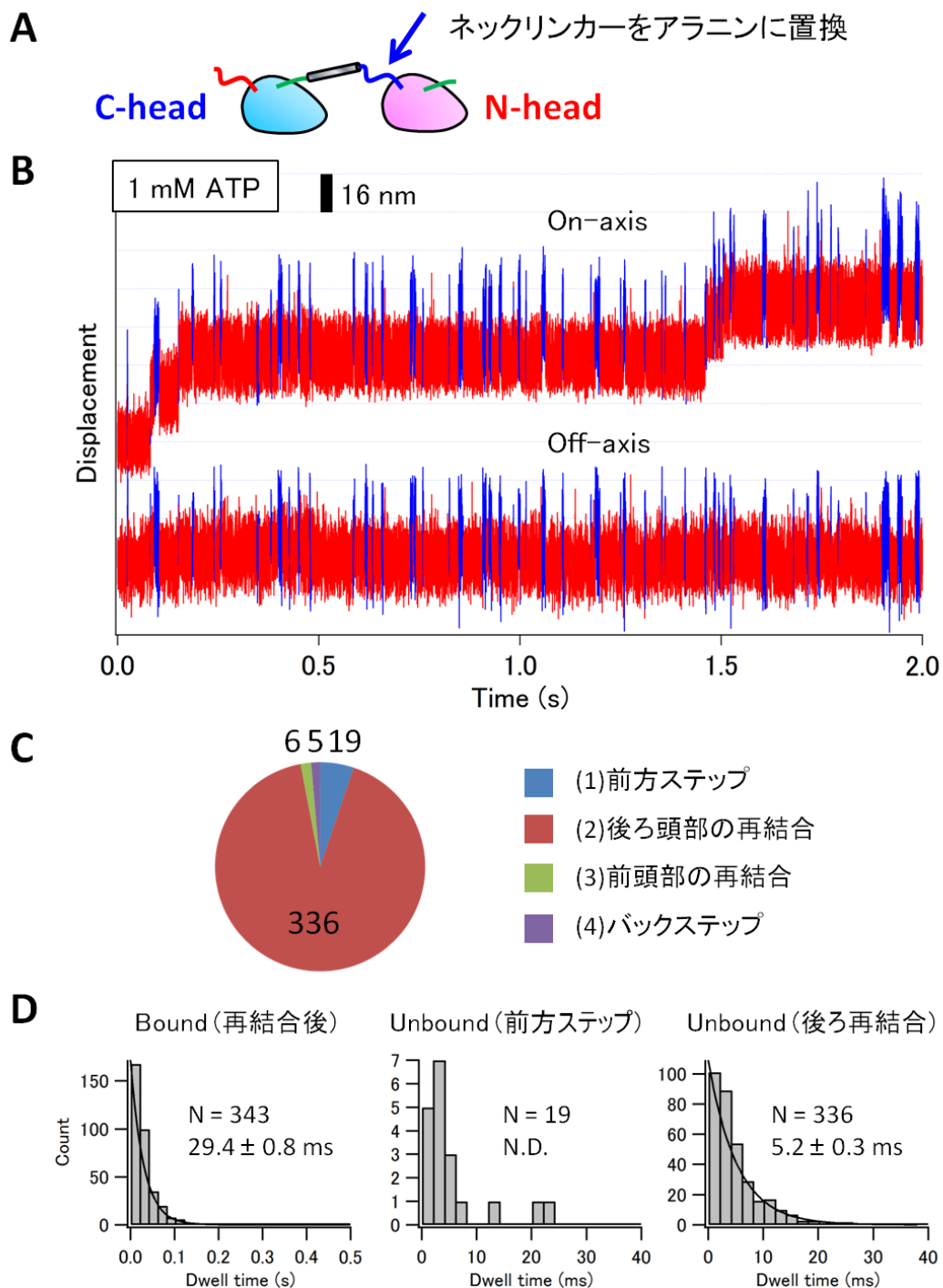


図 4.29 ネックリンカーに変異を導入したタンデムキネシン

(A)タンデムキネシンの2つの頭部をつないでいるN-headのネックリンカーに $\beta 9, \beta 10-9A$ 変異を導入した。(B)C-headの変位の時間変化。後ろ頭部の再結合(青)が頻繁に見られる。

(C)Unbound状態の分類(D)Bound状態(再結合後)、およびUnbound状態(再結合)の持続時間のヒストグラム。どちらも指数関数でフィッティングできた。

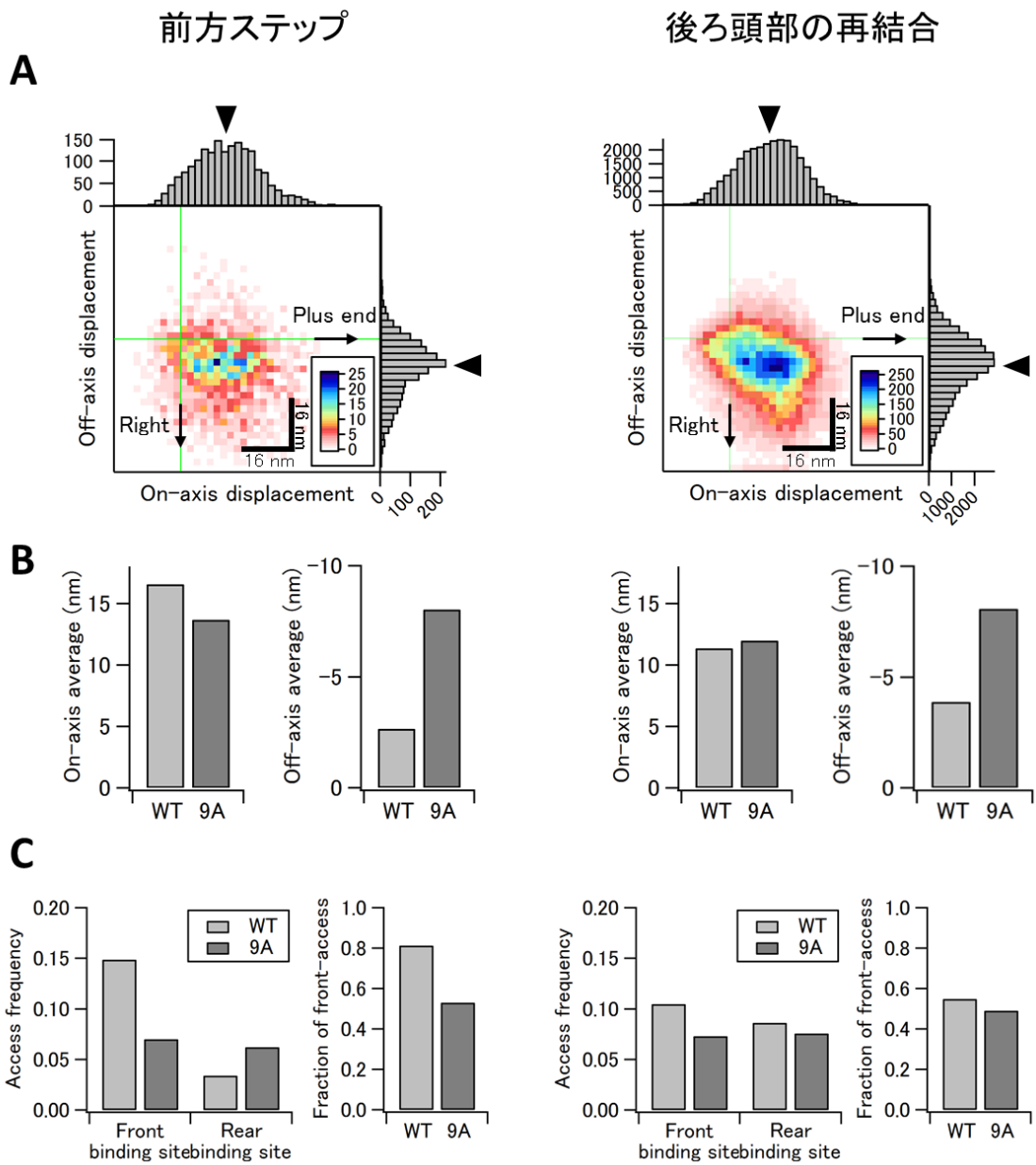


図 4.30 ネックリンカー変異体タンデムキネシンの Unbound 状態の二次元ヒストグラム

(A) Unbound 状態の二次元ヒストグラム。緑線は直前の Bound 状態の平均位置を表す。矢印は 1 次元ヒストグラムの平均位置を表す。(B) 野生型タンデムキネシン (WT) およびネックリンカー変異体 (9A) における、On-axis および Off-axis の平均位置(C)野生型タンデムキネシン (WT) およびネックリンカー変異体 (9A) における、前後の結合サイトへのアクセス頻度ならびに前方結合サイトへのアクセス割合。

4.7 本章のまとめと考察

二つの頭部のネックリンカーと N 末端をタンデムに結合した変異体であるタンデムキネシンの運動を高時間分解能で観察することで、キネシン頭部の選択的結合を説明する 2 つのモデル、Biased binding モデルと Biased diffusion モデルの検討を行った。まずそれぞれの頭部を金コロイド粒子で標識して得たトレースからステップサイズを求め、タンデムキネシンが hand-over-hand で運動することを確認した。続いてゆらぎの増大から頭部の Unbound 状態を検出し、4 種の Unbound 状態を区別することでそれぞれの頭部が後方へ再結合する確率を求めた。その結果、Biased binding メカニズムによってステップすると考えられる N-head では再結合確率が ATP 濃度によらず 12%程度に抑えられている一方、Biased diffusion メカニズムによってステップすると考えられる C-head は ATP 濃度が高いほど前方へステップする確率が向上するものの ATP 飽和条件下でも 34%と高い確率で後ろへの再結合することが明らかになった。さらに Unbound 状態の持続時間を測定することで、N-head, C-head どちらのステップも 3 ms 程度と ATP 飽和条件下の野生型二量体と同じ程度の時間で行われることが明らかになった。また、Bound 状態の持続時間を測定することで、N-head の解離速度が ATP 濃度に依存しない一方で C-head の解離速度は ATP 濃度に依存することを明らかにした。また 2 つの頭部における ATP 加水分解速度の違いから後ろ頭部の状態でネックリンカーが前向きに引っ張られる N-head では ATP 加水分解が促進されていることが示唆された。さらに N-head および C-head の Unbound 状態の二次元ヒストグラムを作成し解析することで、N-head の拡散運動は C-head と比べて前方にバイアスは受けておらず、前後の結合サイトへのアクセス頻度も C-head と変わらないことを明らかにした。

N-head の拡散運動が C-head と比べて前方にバイアスを受けていないにもかかわらず、C-head とは異なり再結合確率が低く抑えられたことから、キネシンの選択的前方ステップは Biased binding メカニズムによって説明可能であることが示唆される。また、C-head は N-head と同じ程度の前方結合サイトへのアクセス頻度を持つにもかかわらず高 ATP 濃度でも高い確率の再結合が見られたことから、Biased diffusion メカニズムだけでは再結合を抑制できず、選択的前方ステップを引き起こせないことが明らかになった。このことから、キネシンの選択的前方ステップには Biased binding メカ

ニズムが不可欠であることが示唆される。また、N-head の解離速度が ATP 濃度に依存しないことから C-head の前方ステップには N-head への ATP 結合およびネックリンカードッキングが不可欠であることが示唆された。このことから、前方ステップ時のネックリンカードッキングは頭部の移動よりもむしろ前方ステップの制御に重要であることが示唆された。

N-head のネックリンカーにドッキングを阻害する変異を導入したタンデムキネシンの C-head の運動を高速一分子観察した。その結果、C-head の解離速度は変わらないが、解離してから 94.6 %の確率で後方に再結合することが明らかになった。この結果から、微小管に結合した頭部のネックリンカードッキングが浮いた頭部の前方への結合に必要であることを示唆された。また、Unbound 状態の 2 次元ヒストグラムを作成することで、ネックリンカーに変異を導入したタンデムキネシンではドッキングによる浮いた頭部の拡散運動の前方シフトが抑えられることが明らかになった。

第 5 章 アンカーされたキネシン頭部の結合解離の高時間分解能観察

第 1 章で述べたように、キネシン頭部が微小管から解離してから結合するまでの時間には頭部の拡散運動以外の律速過程が存在することが示唆されている。しかし、野生型の二量体では微小管に結合した頭部へのネックリンクカードッキングに要する時間と区別できないため、律速過程の詳細は明らかになっていない。一方、タンデムキネシンの N-head の前方ステップや C-head の後方への再結合はもう一方の頭部へのネックリンクカードッキングを必要としないが、これらのステップにおける Unbound 状態の持続時間はそれぞれ 3.4 ± 0.1 ms, 3.3 ± 0.1 ms と拡散運動による 16 nm 前方への移動に要する First passage time (数 μ s) よりも長くなった (図 5.1A)。この結果は解離した頭部が再び結合するまでの時間には拡散運動以外の律速過程が存在することを示唆している。本章ではアンカーモノマーを用いて単頭のキネシンを微小管上に係留し、その結合解離を様々なヌクレオチド条件で測定することにより頭部が浮いた状態から結合するまでの律速過程の詳細を明らかにすることを試みた (図 5.1B)。

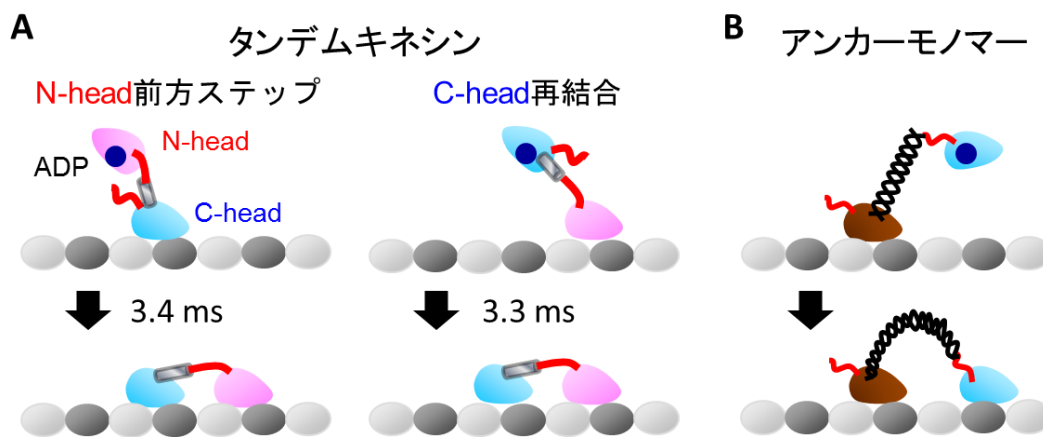


図 5.1 頭部が浮いた状態の持続時間

(A)タンデムキネシンの N-head の前方ステップや C-head の後方への再結合はネックリンクカードッキングによらず、拡散運動のみによって移動し微小管に結合する。(B)アンカーモノマーを用いることでもう一方の頭部の影響を受けずに単頭のキネシンの結合解離を繰り返し観察することができる。

5.1 ATP 存在下でのアンカーモノマーの運動観察

まずは ATP 条件下でアンカーモノマーの運動を観察することで、アンカーモノマーの野生型頭部が外部の影響を受けない単頭キネシンとして機能することを確認し、同時に浮いた頭部の構造変化を検出することを試みた。アンカーモノマーの野生型頭部を金コロイド粒子で標識し、1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下における運動を全反射暗視野顕微鏡で観察した。輝点を二次元ガウス関数でフィッティングすることにより輝点の中心位置を決定し、その時間変化および前後 10 フレームの標準偏差 (4.2 と同様) を図示した。なお、微小管の方向は輝点の並びから決定しており、どちらがプラス端方向であるかは明確ではない。その結果、頭部が数 10 nm の範囲内でステップ状に位置を変える様子が見られた。また、ステップ間ではゆらぎの増大が見られたため、これは微小管から解離した頭部がアンカーを基点に揺らいている Unbound 状態であると考えられる。Bound 状態の分布は分子によって異なり、Bound 状態が On-axis 方向にのみ分布している分子 (図 5.2) もあれば Off-axis 方向も含め二次元的に分布する分子 (図 5.3) も見られた。このような Off-axis 方向のステップは隣り合うプロトフィラメント間を移動したものであると考えられる。

続いて 2.2.3 の Unbound 状態検出プログラムを用いて Unbound 状態の検出を行った。アンカーモノマーは長いリンカーを持つため野生型二量体やタンデムキネシンよりも Unbound 状態の自由度が高く大きなゆらぎを持つが、このプログラムで問題なく Unbound 状態を検出できた。検出結果をもとに Bound 状態の持続時間のヒストグラムを作成したところ、指数関数でよくフィッティングできた。時定数は 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下でそれぞれ 34 ± 1 ms, 39 ± 2 ms, 42 ± 1 ms, 50 ± 2 ms, 80 ± 4 ms, 140 ± 7 ms (平均値 \pm フィッティングエラー) であった (図 5.4A)。Bound 状態の持続時間はアンカーモノマーの微小管からの解離にかかる時間を意味しており、解離にかかる時間が ATP 濃度に依存することからアンカーモノマーの微小管からの解離は ATP 加水分解を伴った反応であることが明らかになった。Bound 状態の時定数の逆数、すなわち ATP 加水分解速度をミカエリス・メンテン式でフィッティングすることで ATP 濃度依存的な速度定数 k_1 と ATP 濃度非依存的な速度定数 k_2 を求めたところ、 $k_1 = 2.4 \pm 0.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_2 = 29.1 \pm 1.2 \text{s}^{-1}$ (平均値 \pm フィッティングエラー) となった (図 5.4B)。これはタンデムキネシンの C-head の解離速度から求めた値 $k_1 = 2.4 \pm 0.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_2 = 28.4 \pm 1.5 \text{s}^{-1}$ に非常に近い結果である。アンカーモノ

マーのネックネックリンカーはアンカーと繋がっているため、張力の影響で ATP 加水分解が阻害または促進されている可能性が考えられたが、この結果からアンカーモノマーはネックリンカーが外力を受けないタンデムキネシンの C-head と同等の条件であるとみなしてよいと考えられる。

続いて Unbound 状態の持続時間のヒストグラムを作成したところ、指数関数でよくフィッティングできた。時定数は 1 mM, 200 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ATP 条件下でそれぞれ 3.9 ± 0.2 ms, 3.1 ± 0.4 ms, 2.2 ± 0.1 ms, 2.1 ± 0.1 ms, 2.8 ± 0.2 ms, 5.1 ± 0.4 ms (平均値 \pm フィッティングエラー) であった (図 5.5)。条件ごとのばらつきは大きいものの Unbound 状態の持続時間に ATP 濃度依存性は見られず、平均値を計算すると 3.2 ± 0.2 ms であった。アンカーモノマーの Unbound 状態の持続時間を野生型二量体の Unbound 状態の ATP 非依存的過程の持続時間 2.34 ms と t 検定によって比較したところ、t 値は 1.85 と自由度 5 の 5 %水準値 2.57 よりも低く、優位な差はないことが示された。もう一方の頭部の構造変化の影響を受けないアンカーモノマーでも野生型二量体と同じ程度長い Unbound 状態が観察されたことから、微小管から解離した頭部が再び微小管に結合するまでの間に何らかの律速過程が存在し、それは浮いた頭部に関わるものである可能性が示唆された。

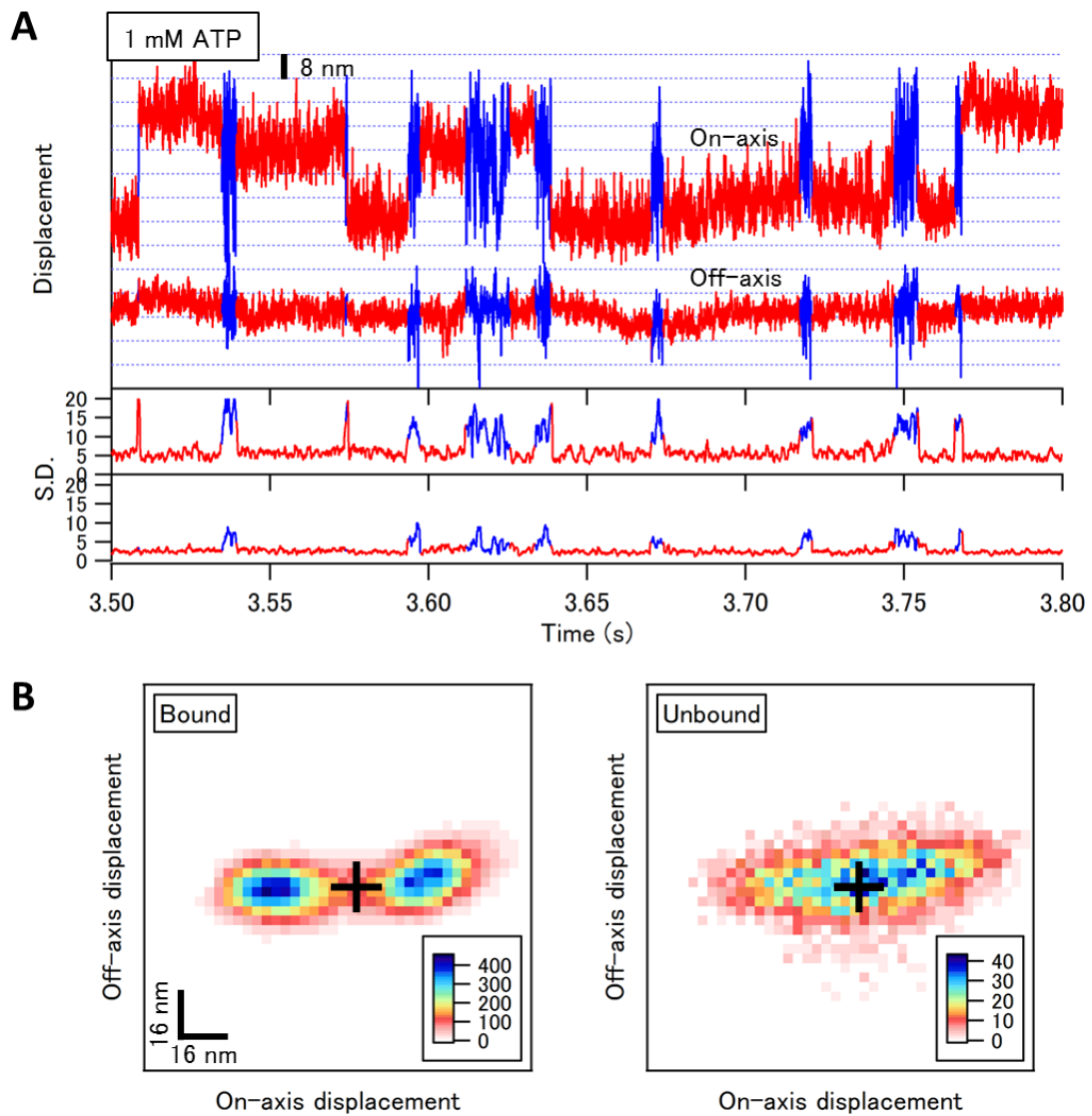


図 5.2 ATP 条件下のアンカーモノマーの運動観察

(A)アンカーモノマーに標識した金コロイド粒子の On-axis および Off-axis 方向の変位の時間変化(赤: Bound 状態, 青: Unbound 状態)。S.D.は前後 10 フレームの標準偏差。(B)Bound 状態および Unbound 状態の二次元ヒストグラム。Bound 状態は On-axis 方向に 2 状態存在している。アンカー (E236A 変異体頭部) は 2 つの Bound 状態の中間 (黒マーカー) に位置していると考えられる。

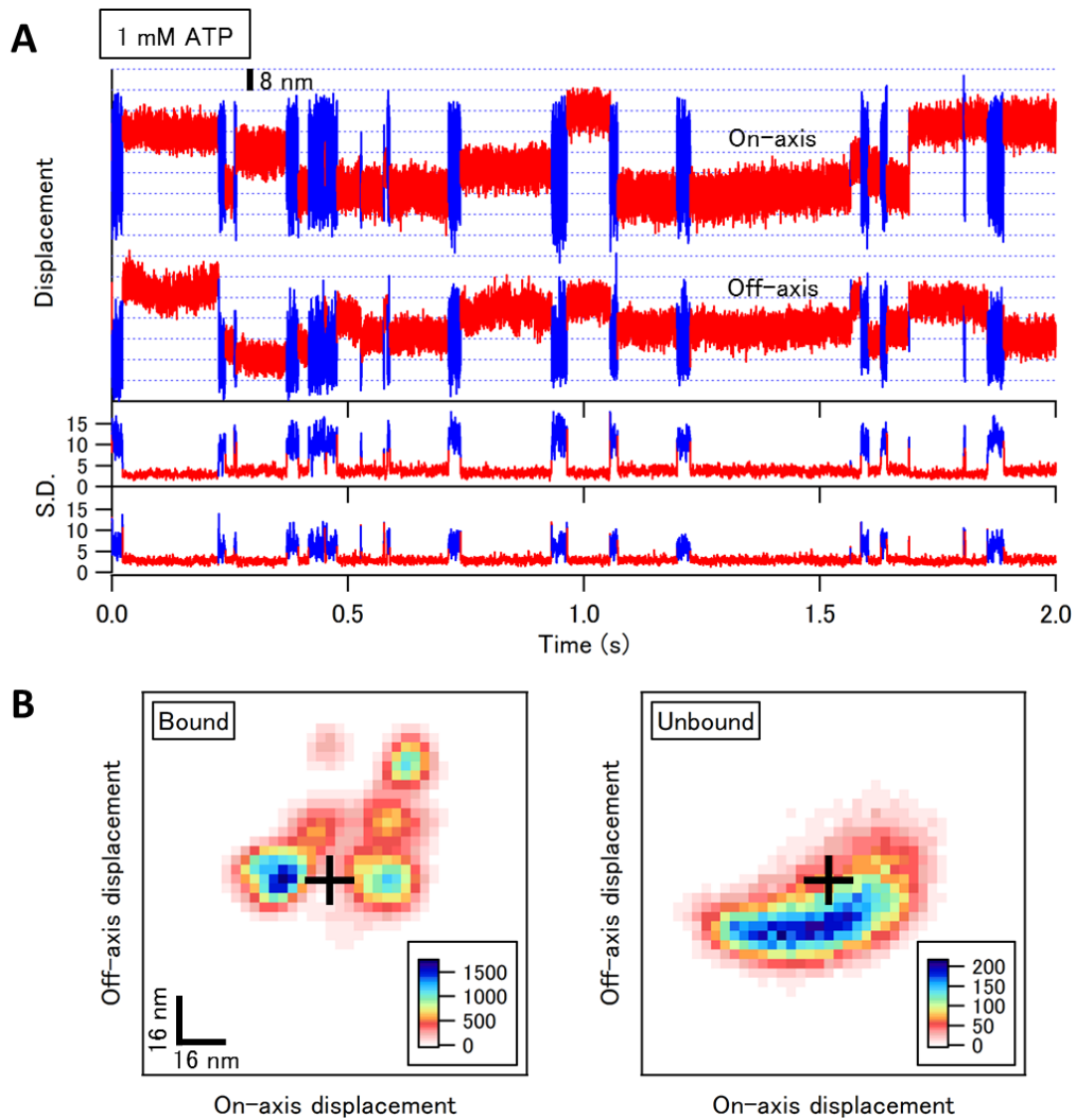


図 5.3 Bound 状態が二次元的に分布している例

(A)アンカーモノマーに標識した金コロイド粒子の On-axis および Off-axis 方向の変位の時間変化 (赤: Bound 状態, 青: Unbound 状態)。(B) Bound 状態および Unbound 状態の二次元ヒストグラム。Bound 状態は Off-axis 方向にも分布しており、全部で 6 状態が確認できる。

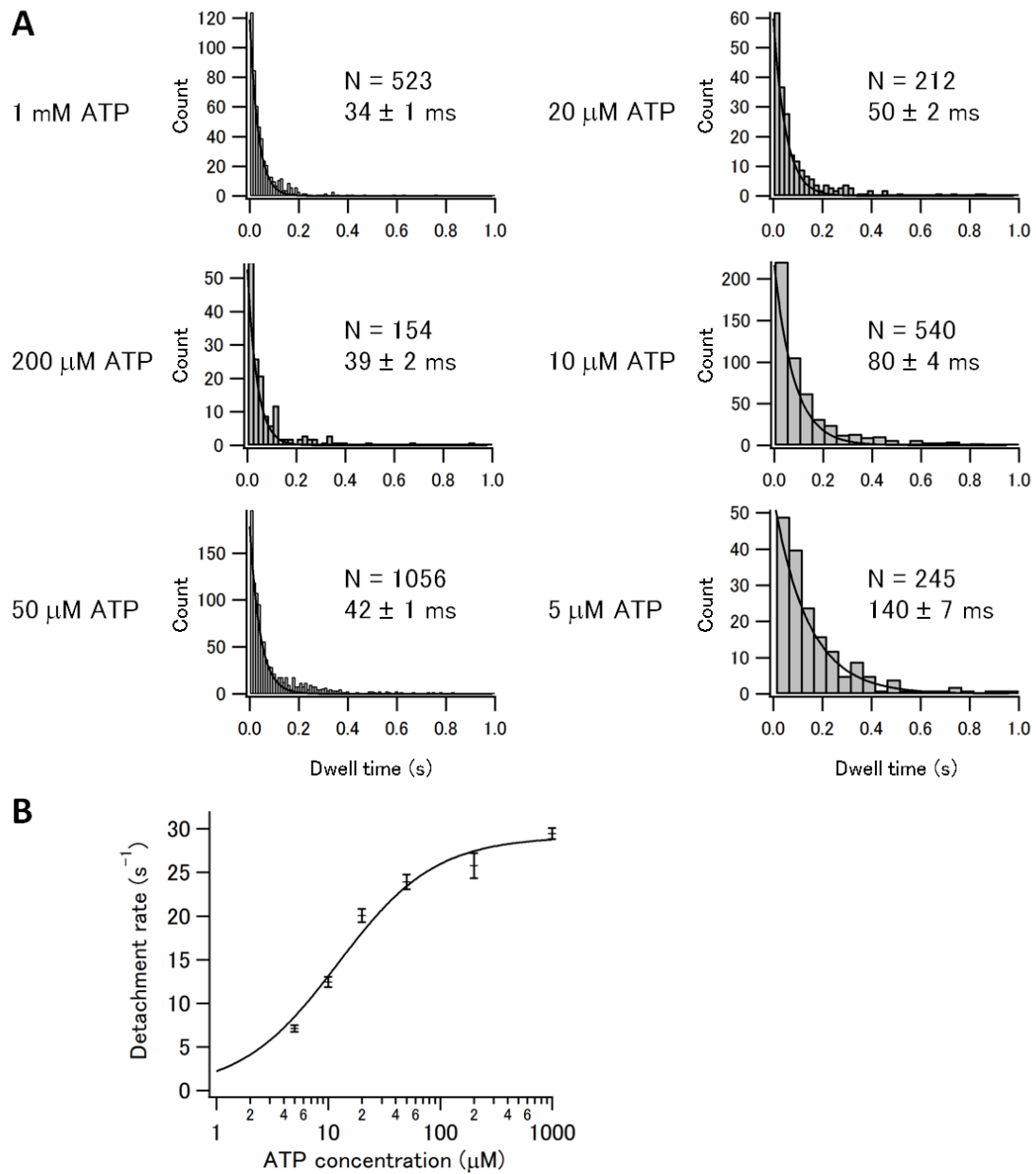


図 5.4 ATP 条件下の Bound 状態の持続時間

(A)各 ATP 濃度でヒストグラムを作成し、指数関数でフィッティングすることにより時定数を求めた。5 μM ATP 条件下では 10 ms 以下のデータが 50 個以上見られたためヒストグラムの作成範囲から除外した。Unbound 状態の誤検出によるものであると考えられる。

(B)Bound 状態の持続時間の逆数（解離速度）と ATP 濃度。解離速度は ATP 濃度に依存しており、ミカエリス・メンテン式でフィッティングすることで ATP 濃度依存的な速度定数 k_1 と ATP 濃度非依存的な速度定数 k_2 を求めた。

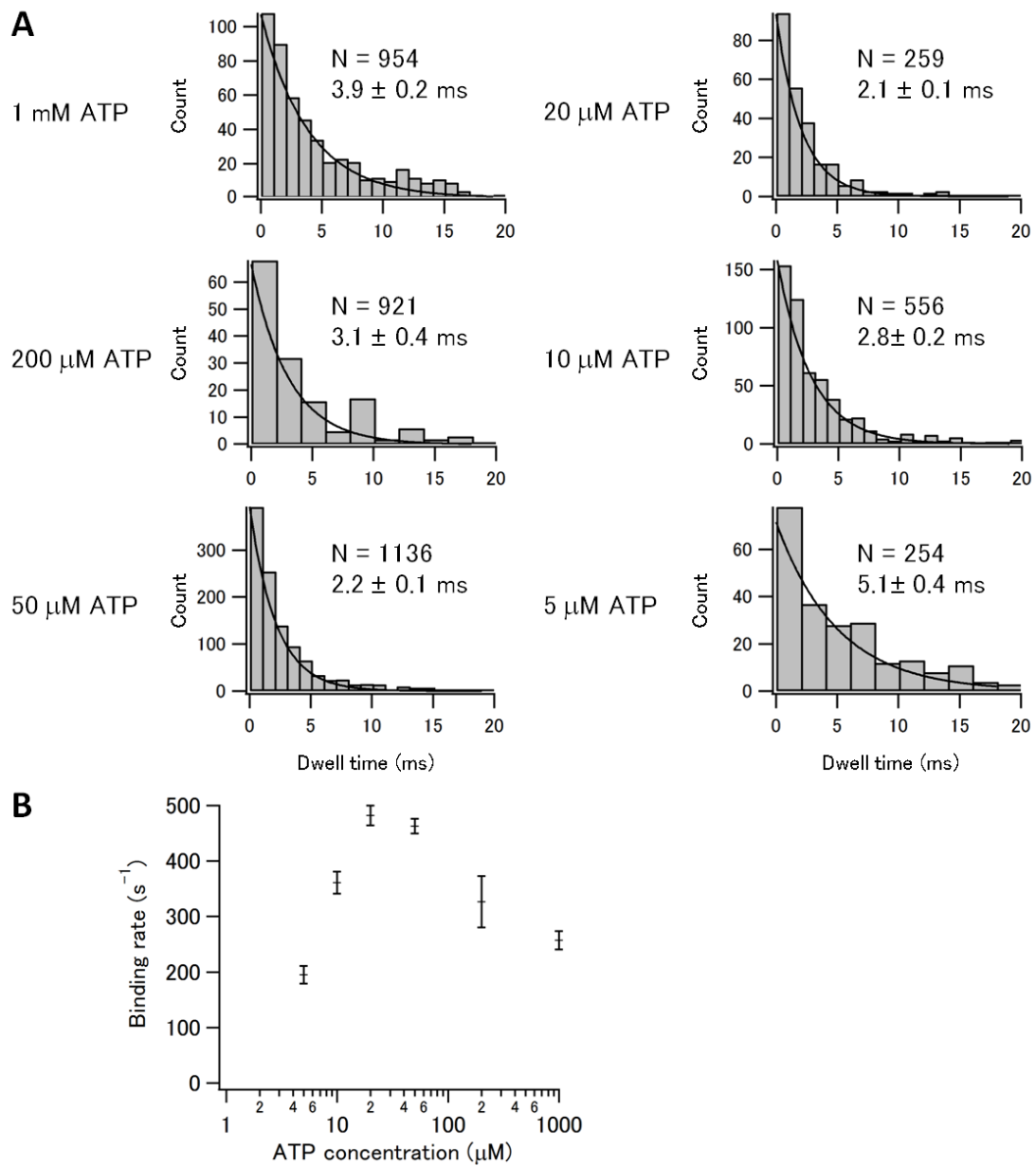


図 5.5 ATP 条件下の Unbound 状態の持続時間

(A)各 ATP 濃度でヒストグラムを作成し、指数関数でフィッティングすることにより時定数を求めた。(B)Bound 状態の持続時間の逆数 (結合速度) と ATP 濃度の関係。結合速度に ATP 濃度依存性は見られない。

5.2 ATP-Pi 条件下でのアンカーモノマーの運動観察

ATP 条件でアンカーモノマーを観察することで、微小管から解離した頭部が再び微小管に結合するまでに何らかの律速過程が存在する可能性が示唆された。続いては、律速過程が具体的にどのようなものであるのか明らかにしたい。まず考えられる可能性は、頭部が微小管から解離した時点ではまだ ADP-Pi 状態であり、リン酸の解離は頭部が微小管から浮いた状態でなされる、というモデルである。ADP-Pi 状態で頭部と微小管は強結合の状態である [Romberg, 1993] ため、頭部の解離がリン酸の解離に先行するとは考えにくい、このモデルを用いると ADP 状態の頭部が微小管に結合した中間状態を 2 種類必要としないことから Gilbert らによってかつて提唱された [Gilbert, 1995]。このモデルが正しいならば拡散運動と比べて長い Unbound 状態をリン酸解離に伴う構造変化によって説明することができる。リン酸の解離と頭部の微小管からの解離のどちらが先に起きるのか明らかにするために、ATP 条件にリン酸を付加しリン酸の解離を遅くした条件でアンカーモノマーの運動を観察した。

アンカーモノマーの野生型頭部を金コロイド粒子で標識し、1 mM ATP に 10 mM KPi を加えた条件下における運動を全反射暗視野顕微鏡で観察した。輝点を二次元ガウス関数でフィッティングすることにより輝点の中心位置を決定し、その時間変化を図示した (図 5.6A)。ATP 条件の場合と同様にゆらぎの増大を挟んでステップ状に位置を変える様子が見られた。続いて 2.2.3 の Unbound 状態検出プログラムを用いて Unbound 状態の検出を行った。検出結果をもとに Bound 状態および Unbound の持続時間のヒストグラムを作成したところ、どちらも指数関数でよくフィッティングできた。時定数は Bound 状態では 50 ± 3 ms であり、Unbound 状態では 1.9 ± 0.1 ms であった (図 5.6B)。Bound 状態および Unbound 状態の持続時間を 1 mM ATP 条件下と比べると Bound 状態の持続時間は長くなった一方、Unbound 状態の持続時間は長くならなかった。この結果はリン酸の解離が Bound 状態で起きることを示唆しており、頭部の解離がリン酸の解離に先行するというモデルを否定するものである。したがって、微小管から解離した直後の頭部は ADP 状態であり、その後の律速過程はヌクレオチド状態に関わらないことが示唆される。

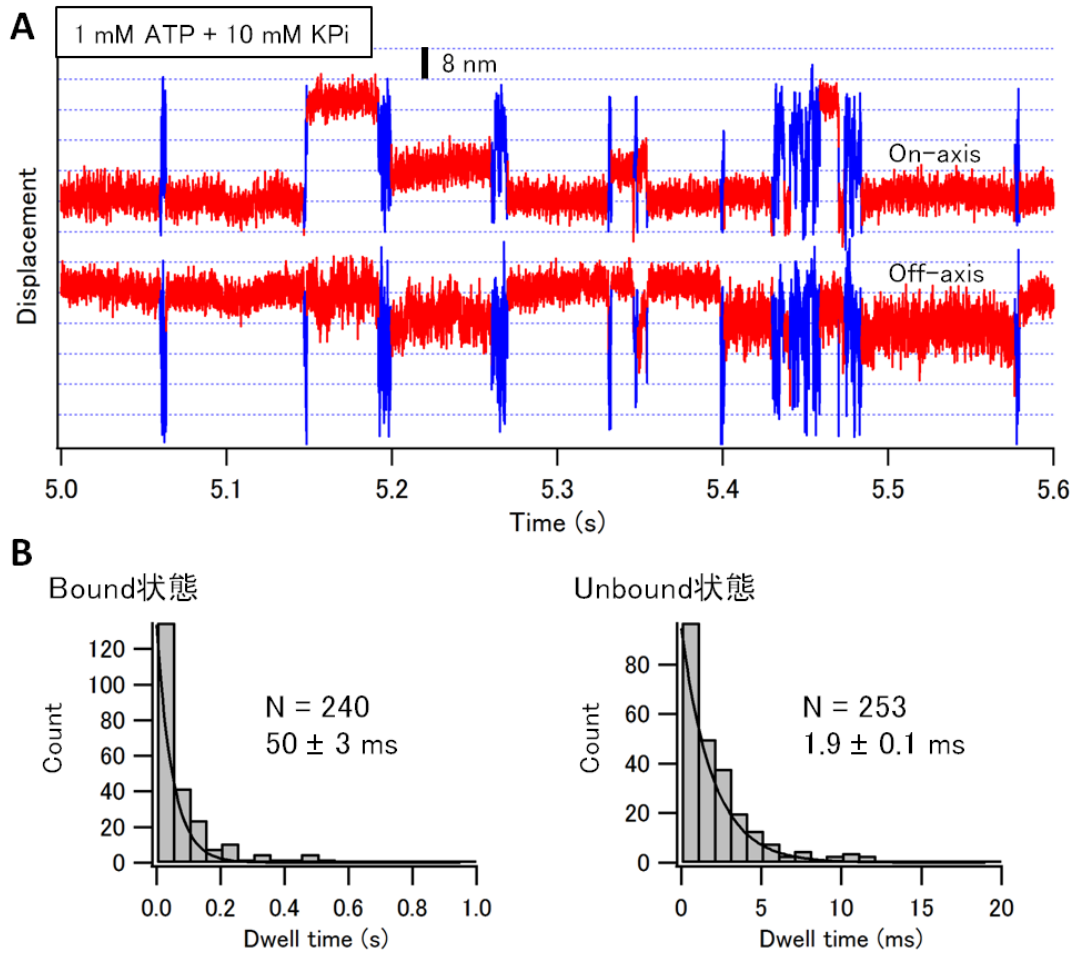


図 5.4 ATP-Pi 条件下のアンカーモノマーの運動観察

(A)アンカーモノマーに標識した金コロイド粒子の On-axis および Off-axis 方向の変位の時間変化 (赤: Bound 状態, 青: Unbound 状態)。 (B)Bound 状態および Unbound 状態の持続時間のヒストグラム。指数関数でフィッティングすることにより時定数を求めた。

5.3 ADP 存在下でのアンカーモノマーの運動観察

アンカーモノマーのATP加水分解サイクルにおける2, 3 msのUnbound状態が拡散運動とは異なる律速過程を含むことを確かめるために、ADP条件下でアンカーモノマーの運動を観察した。ADP条件における単量体キネシンの運動スキームは、まずヌクレオチドフリーで微小管に結合した頭部にADPが結合し弱結合状態となり、微小管から解離した頭部が再び微小管に結合するとADPを解離し結合が安定化するという経路をたどると考えられる(図5.7)。このスキームは全て可逆的であり、はじめのADP-微小管結合状態は、ADPが解離し微小管との結合が安定化する反応の逆反応であるため、2つのADP-微小管結合状態に構造上の違いはないと考えられる。したがって、アンカーモノマーをADP条件下で観察した場合に検出されるUnbound状態は律速過程を含まず、ATP条件下のUnbound状態よりも短い持続時間を示すことが予想される。

アンカーモノマーの野生型頭部を金コロイド粒子で標識し、1 mM, 10 μ M, 2 μ M ADP条件下における運動を全反射暗視野顕微鏡で観察した。輝点を二次元ガウス関数でフィッティングすることにより輝点の中心位置を決定し、その時間変化を図示した(図5.8A,B)。ATP条件の場合と同様にゆらぎの増大を挟んでステップ状に位置を変える様子が見られた。続いて2.2.3のUnbound状態検出プログラムを用いてUnbound状態の検出を行った。検出結果をもとにBound状態の持続時間のヒストグラムを作成したところ、いずれの条件においても指数関数でよくフィッティングできた。時定数は1 mM, 10 μ M, 2 μ M ADP条件下でそれぞれ 40 ± 2 ms, 194 ± 18 ms, 248 ± 27 ms (平均値 \pm フィッティングエラー)であった(図5.9)。Bound状態の持続時間、すなわち頭部の解離にかかる時間がADP濃度に依存することから、ADP条件下で見られる頭部の解離はADPの結合を伴う反応であることが確かめられた。続いてUnbound状態の持続時間のヒストグラムを作成したところ、いずれの条件においても指数関数でよくフィッティングできた。時定数は1 mM, 10 μ M, 2 μ M ADP条件下でそれぞれ 2.3 ± 0.1 ms, 1.2 ± 0.1 ms, 1.9 ± 0.2 ms (平均値 \pm フィッティングエラー)であった(図5.9)。低ADP濃度条件下においてUnbound状態の持続時間が1-2 ms程度と短かったことから、低ADP濃度条件下で見られるUnbound状態にはATP存在下で見られた律速過程は含まれないことが示唆される。1 mM ADP条件下においては2 ms程度の長いUnbound状態が観察されたが、これはADP濃度が高いためにADPの解離速度が低下したためであると考えられる。

ADP 存在下における頭部微小管との結合および解離は可逆的な反応であり、2 つの ADP-微小管結合状態は全く同じ状態であるため、ATP 存在下だけに見られた Unbound 状態の律速過程は加水分解サイクルにおける 2 つの ADP-微小管結合状態が異なる状態であることに起因することが明らかになった。律速過程が ms 程度の時間を持つことから、この律速過程には頭部のアロステリックな構造変化が含まれることが示唆される。このように考えることで、キネシン頭部の ATP 加水分解サイクルにおける 2 つの ADP-微小管結合状態において ADP 解離が異なる制御を受ける仕組みを頭部の構造状態の違いから説明することができる。

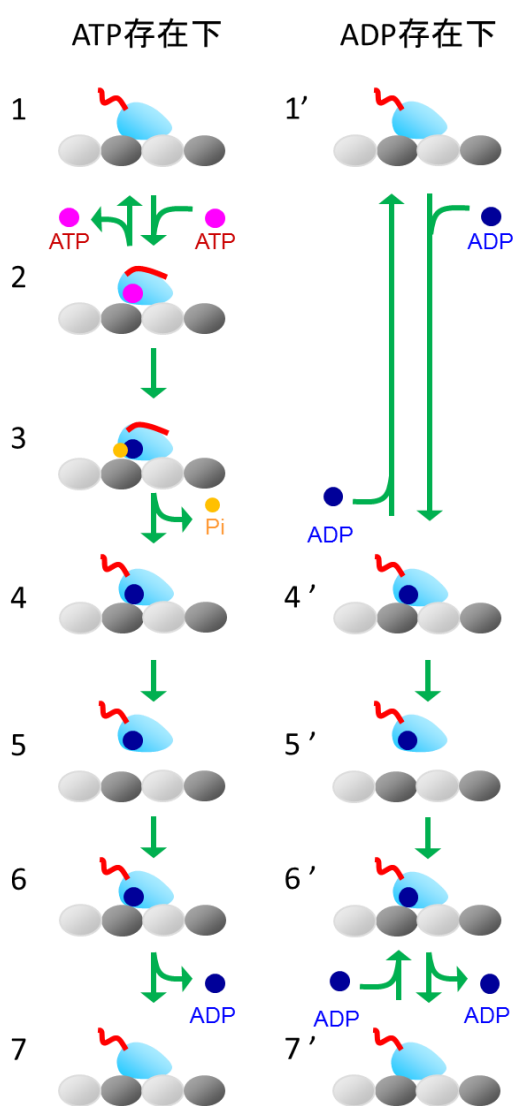


図 5.7 ATP,ADP 存在下における単頭キネシンの運動スキーム

(ATP 存在下) 加水分解サイクルにおける 2 つの ADP-微小管結合状態 (4, 6) では ADP 解離が異なる制御を受ける必要があるため、これらは異なる状態であることが示唆されている。(ADP 存在下) ヌクレオチドフリーで微小管に結合した状態 (1') に ADP が結合すると弱結合状態 (4') となり、微小管から解離する (4'→5')。微小管に再び結合すると ADP を解離し結合が安定化する (6'→7')。このスキームにおいて、ADP が結合し弱結合状態に移行する反応 (1'→4') は ADP が解離し結合が安定化する反応 (6'→7') の逆反応であるため、2 つの ADP-微小管結合状態 (4', 6') は全く同じ状態であると考えられる。

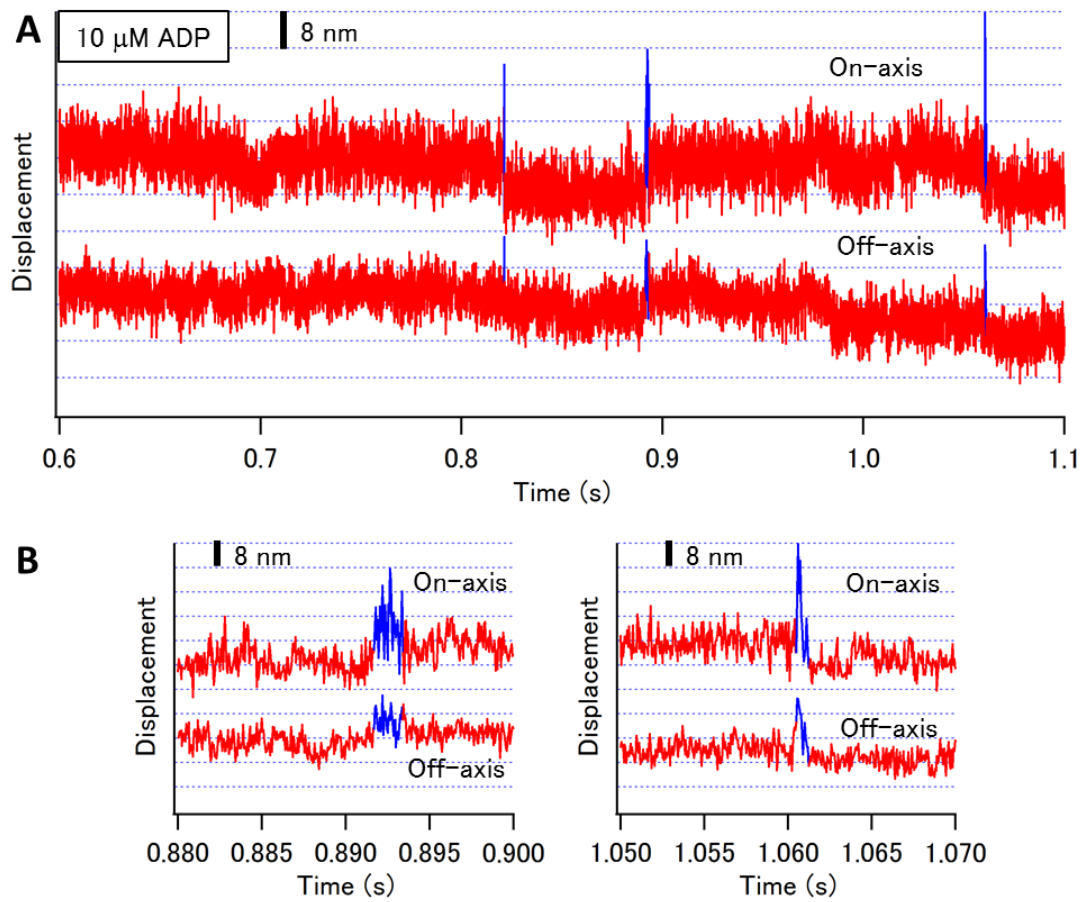


図 5.8 ADP 条件下のアンカーモノマーの運動観察

(A)アンカーモノマーに標識した金コロイド粒子の On-axis および Off-axis 方向の変位の時間変化 (赤: Bound 状態, 青: Unbound 状態)。(B)Unbound 状態周辺の拡大図。

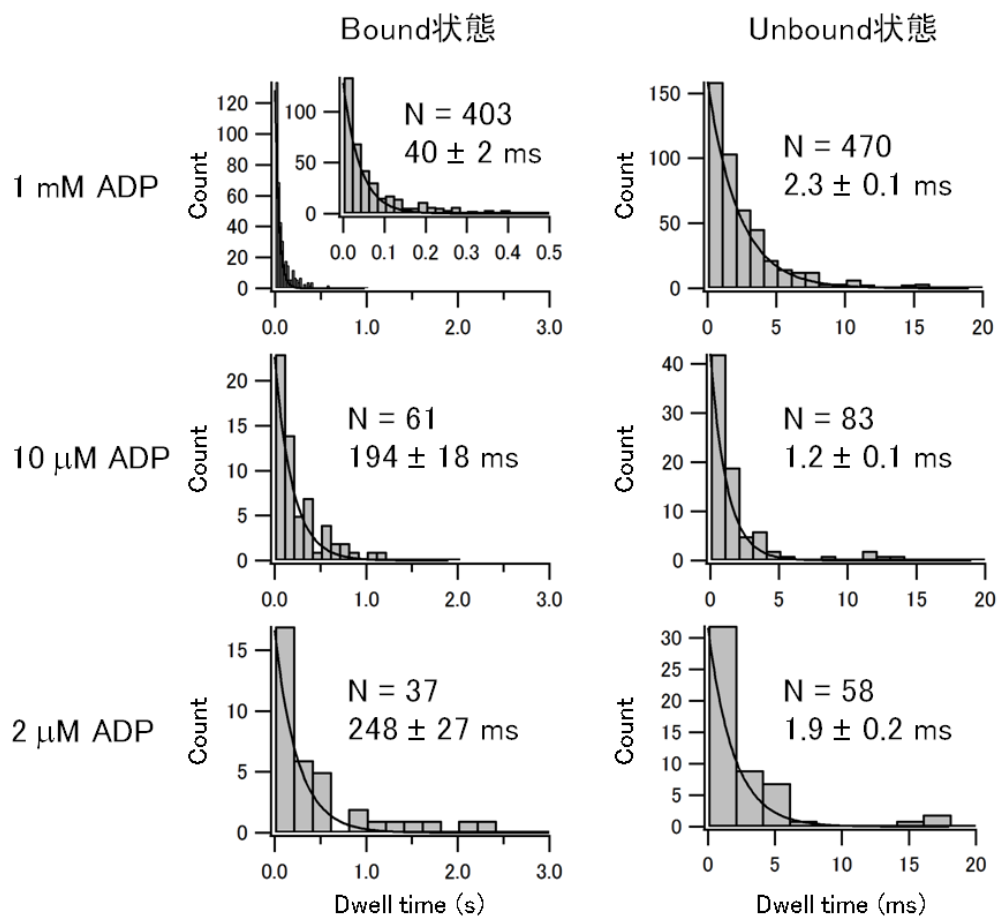


図 5.9 ADP 条件下の Bound 状態および Unbound 状態の持続時間

各 ADP 濃度で Bound 状態および Unbound 状態の持続時間を測定し、ヒストグラムを指数関数でフィッティングすることにより時定数を求めた。

5.4 ADP-SO₄条件下でのアンカーモノマーの運動観察

これまでの実験から、微小管から解離した頭部が再び微小管に結合するまでの時間には拡散運動以外のアロステリックな構造変化を含む律速過程が含まれており、単頭キネシンの ATP 加水分解サイクルにおける 2 つの ADP-微小管結合状態は構造的に異なる状態であることが示唆された。そこで私はリン酸を解離し微小管から解離した直後の頭部ではネックリンカーがドッキングしており (ADP ドック状態)、浮いた頭部がネックリンカーのアンドッキングを含む構造変化をするまでは微小管に結合できないという仮説を立てた。この仮説を検証するために、ADP に硫酸イオンを加えた条件でアンカーモノマーの運動を観察した。硫酸イオンは ADP 状態でネックリンカーをドッキングさせることが知られている (図 5.10A,B[Sindelar, 2002]) ため、ADP に硫酸イオンを加えた条件では浮いた頭部に ADP と硫酸イオンが結合しネックリンカーがドッキングした状態が存在すると考えられる (図 5.10C)。したがって、ADP ドック状態の頭部が微小管に結合できないならば、ADP に硫酸イオンを加えた条件では ADP だけの条件と比べて長い Unbound 状態が検出されると考えられる。

硫酸イオンを付加するとイオン強度が増大するため、強いイオン強度の影響でキネシン頭部と微小管の親和性が低下する可能性が考えられる。そこでまずは 2 μ M ADP に KCl を加えない条件と 40 mM KCl を加えた条件で運動を観察し Bound 状態および Unbound 状態の持続時間を測定し、20 mM KCl 条件の結果 (4.3 で測定したもの) と比較しイオン強度の影響を調べることにした。どちらのヒストグラムも指数関数でフィッティングでき、Bound 状態の時定数は 0 mM, 40 mM KCl 存在下でそれぞれと 359 \pm 33 ms, 246 \pm 20 ms なり、Unbound 状態の時定数はそれぞれ 1.3 \pm 0.2 ms, 1.6 \pm 0.1 ms となった (図 5.11A)。20mM KCl 条件の結果と比較するとイオン強度が高いほど Bound 状態が短くなったことからイオン強度の影響で頭部と微小管の親和性が低下したことが示唆されるが、Unbound 状態の持続時間には顕著なイオン強度依存性は見られなかった (図 5.11B)。

続いてアンカーモノマーの野生型頭部を金コロイド粒子で標識し、2 μ M ADP に 10, 20 mM Li₂SO₄を加えた条件下における運動を全反射暗視野顕微鏡で観察した。なお、イオン強度が高くなりすぎないために KCl 濃度は 0 mM とした。輝点を二次元ガウス関数でフィッティングすることにより輝点の中心位置を決定し、その時間変化を図示した (図 5.12)。ADP 条件の場合と同様にゆらぎの増大を挟んでステップ状に位置を変え

る様子が見られたが、ときおり 10 ms を超える長時間の Unbound 状態が見られた。続いて 2.2.3 の Unbound 状態検出プログラムを用いて Unbound 状態の検出を行った。検出結果をもとに Bound 状態の持続時間のヒストグラムを作成したところ、いずれの条件においても指数関数でよくフィッティングできた。時定数は 10, 20 mM Li₂SO₄ 存在下でそれぞれ 28 ± 1 ms, 52 ± 6 ms (平均値 ± フィッティングエラー) であった (図 5.13)。どちらの条件でも 2 μM ADP 条件下の Bound 状態の持続時間よりも Bound 状態は短くなったが、これは 2 μM の ADP が結合する時間としては速すぎるため、微小管に弱結合した頭部が ADP (弱結合) 状態のまま再び解離した様子を含んでいると考えられる。この結果から、硫酸イオンの存在により ADP 解離が阻害されていることが示唆される。

Unbound 状態には持続時間の長いものと短いものが見られた。これら 2 種類の Unbound 状態の持続時間は通常のヒストグラムでは適切に表すことができないため、累積的なヒストグラムを作成した。時間の短い Unbound 状態はアンドック状態の頭部が微小管に結合する過程だけを含んでおり、時間の長い Unbound 状態はネックリンカーがドック状態からアンドック状態に遷移する過程とアンドック状態の頭部が微小管に結合する過程の 2 過程を含んでいると考えられる。そこでヒストグラムを指数関数的分布と二重指数関数的分布を足し合わせた式

$$N \left[(1-p)(1 - \exp(-x/\tau_1)) + P_{\text{double}} \frac{\tau_2(1 - \exp(-x/\tau_2)) - \tau_1(1 - \exp(-x/\tau_1))}{\tau_2 - \tau_1} \right]$$

でフィッティングした。ただし N はヒストグラムのデータ数、 P_{double} は二重指数分布を取る割合であり、アンドック状態の頭部が微小管に結合する過程の時定数 τ_1 はどちらの分布でも共通の値とした。比較のため 0 mM Li₂SO₄, 0 mM KCl 条件下の Unbound 状態の持続時間でも同様の解析を行った。フィッティングの結果、二重指数分布の割合 P_{double} は 0 mM, 10 mM, 20 mM Li₂SO₄ 存在下でそれぞれ 0.34, 0.52, 0.59 となった。また、アンドック状態の頭部が微小管に結合する過程の時定数 τ_1 はそれぞれ 1.23 ± 0.05 ms, 1.43 ± 0.02 ms, 1.35 ± 0.03 ms となり、ネックリンカーがドック状態からアンドック状態に遷移する過程の時定数 τ_2 はそれぞれ 6.7 ± 0.2 ms, 11.6 ± 0.05 ms, 30.6 ± 0.13 ms となった (図 5.14)。時定数 τ_1 は硫酸イオン濃度に依存せず 1-2 ms 程度であり、前節で測定した結果と近いことから、時間の短い Unbound 状態は硫酸イオンの影響を受けずネックリンカーがドッキングしなかった場合であることが示唆される。また、二重指数分布の割合が硫酸イオン存在下で増加し、硫酸イオン濃度が高いほど時定数 τ_2 が大きいことから、時間の長い Unbound 状態は硫酸イオンの存在によってネックリンカー

がドッキングし頭部が微小管に結合しづらくなった状態であることが示唆される。これらの結果から、ADP ドック状態のキネシン頭部は微小管に結合できず、結合するためにはネックリンカーのアンドッキングが必要であることが示唆された。この結果は微小管から解離した直後の頭部ではネックリンカーがドッキングしており、浮いた頭部がネックリンカーのアンドッキングを含む構造変化をするまでは微小管に結合できないという仮説を支持する結果である。

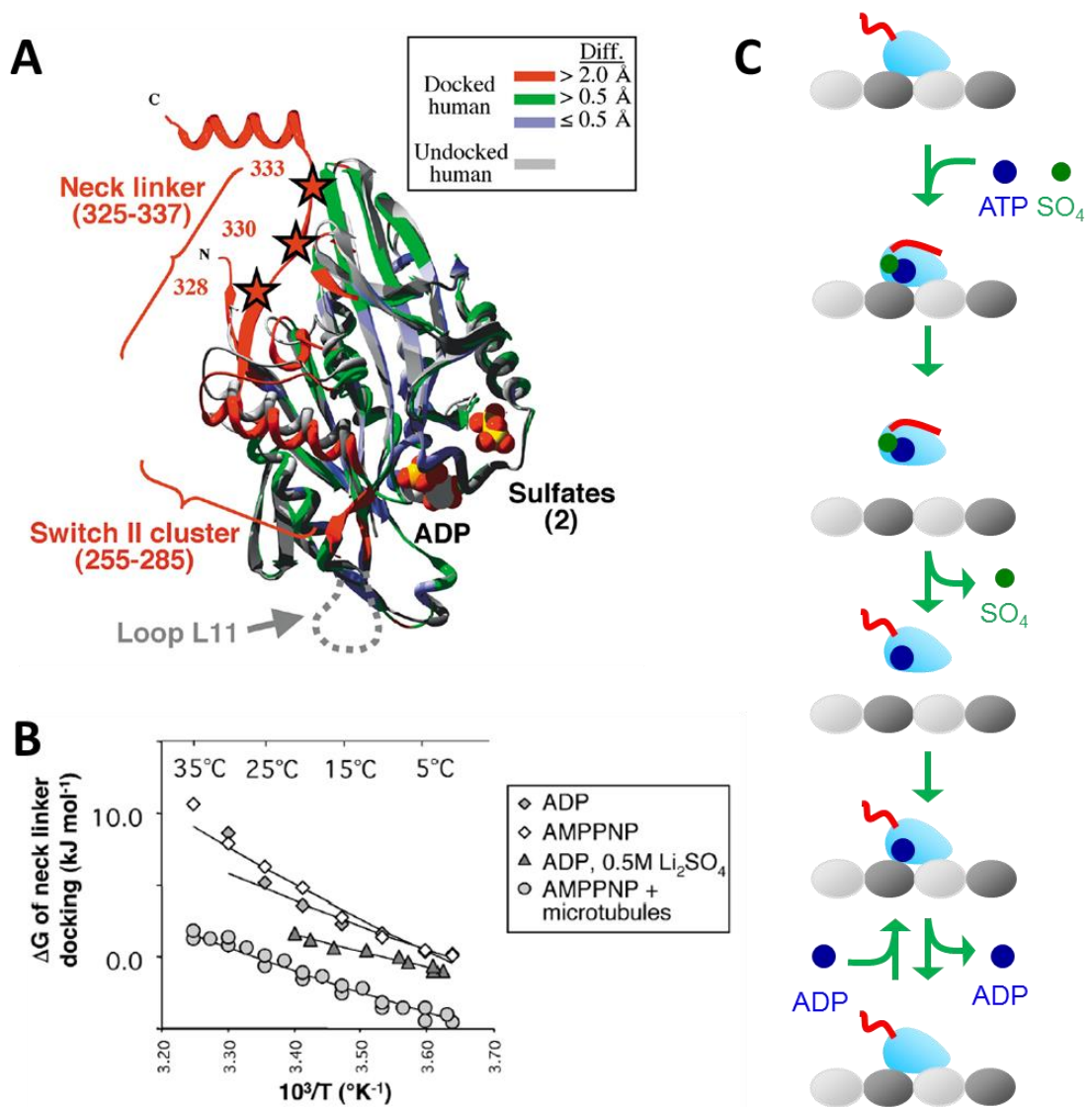


図 5.10 ADP- SO_4 条件下でネックリンカーはドック状態を取る (A,Bは[Sindelar, 2002]より引用)

(A)ADP および硫酸イオンが結合したキネシン頭部を下方方向から見た図。上が微小管プラス端方向、下が微小管マイナス端方向である。硫酸イオンはヌクレオチドポケットの周辺に結合し、ネックリンカードッキング状態を安定させる。(B)ネックリンカードッキングに伴う自由エネルギー変化。ADP 条件ではドッキングを妨げるエネルギー障害があるが、ADP- SO_4 条件ではエネルギー変化量が減り AMP-PNP 状態に近づく。(C)ADP- SO_4 条件における単頭キネシンの想定される運動スキーム。頭部に ADP と硫酸イオンが結合するとドッキングが安定化し、硫酸の解離およびネックリンカーのアンドッキングの後に頭部が再び微小管に結合すると考えられる。

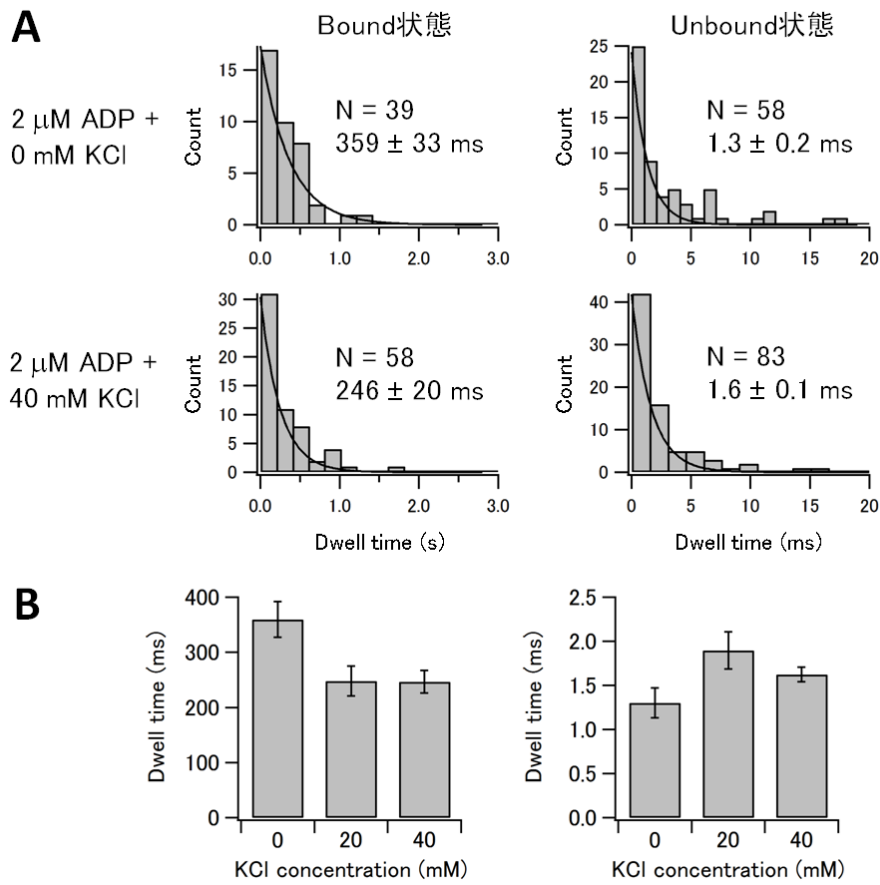


図 5.11 ADP 条件における Bound 状態および Unbound 状態の持続時間の KCl 濃度依存性
 (A) 2 μ M ADP に 0 mM, 40 mM KCl を加えた条件で Bound 状態および Unbound 状態の持続時間をそれぞれ測定し、ヒストグラムを指数関数でフィッティングすることで時定数を求めた。(B) 2 μ M ADP 条件下における Bound 状態、Unbound 状態の持続時間の KCl 濃度依存性。

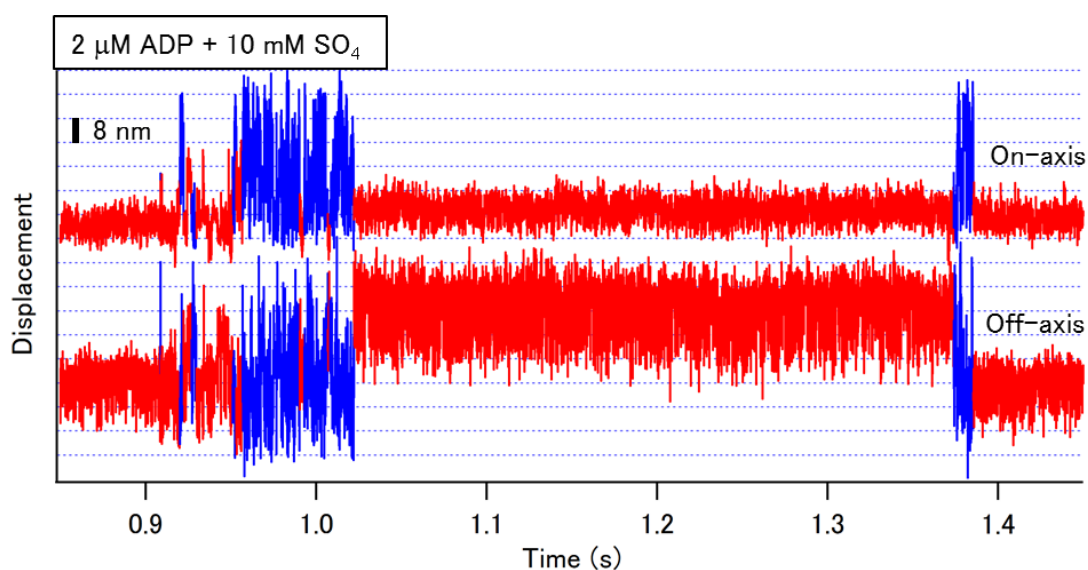


図 5.12 ADP-SO₄ 条件下のアンカーモノマーの運動観察

アンカーモノマーに標識した金コロイド粒子の On-axis および Off-axis 方向の変位の時間変化 (赤: Bound 状態, 青: Unbound 状態)。時間の長い Unbound 状態が見られる。

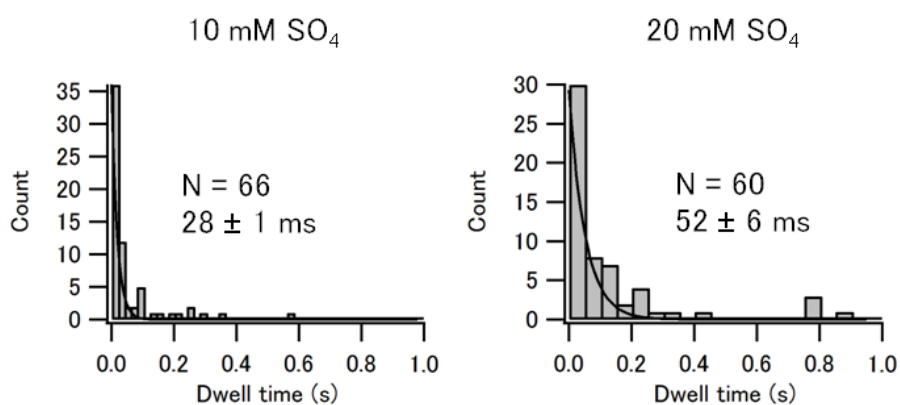


図 5.13 ADP-SO₄ 条件下の Bound 状態の持続時間

10 mM, 20 mM Li₂SO₄ 存在下でそれぞれヒストグラムを作成し、指数関数でフィッティングすることにより時定数を求めた。

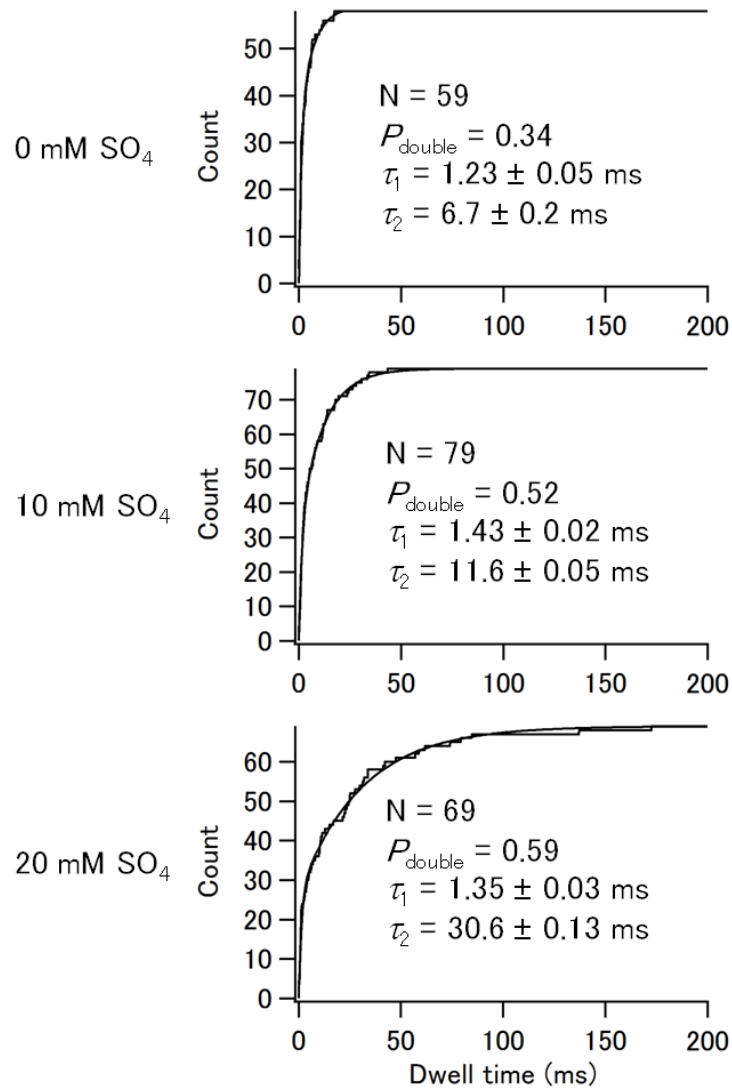


図 5.14 ADP-SO₄ 条件下の Unbound 状態の持続時間

0 mM, 10 mM, 20 mM Li₂SO₄ 存在下でそれぞれ累積的なヒストグラムを作成し、指数関数的分布と二重指数関数的分布の足し合わせでフィッティングすることで二重指数関数の割合 P_{double} と時定数 τ_1 , τ_2 を求めた。

5.5 本章のまとめと考察

微小管から浮いた状態に含まれる律速過程を明らかにするために、アンカーモノマーを用いることで単頭キネシンの微小管との結合解離を観察した。まず ATP 条件で運動を観察することで、Unbound 状態が 2, 3 ms 程度であることを明らかにし、律速過程の存在が示唆された。続いて ATP-Pi 条件で運動を観察することで律速過程はリン酸の解離とは無関係であることを示した。ADP 条件で運動を観察することで、低 ADP 濃度では Unbound 状態が 1 ms 程度であることを明らかにした。この結果から、単頭の ATP 加水分解サイクルにおける 2 つの ADP-微小管結合状態は構造的に異なる状態であることが明らかになった。ADP-SO₄ 条件で運動を観察することで、硫酸イオンは頭部の結合を阻害することが明らかになった。この結果から、浮いた頭部の構造変化はネックリンカーのアンドッキングを含む構造変化であることが示唆された。

以上の結果から、キネシン頭部の新しい ATP 加水分解サイクルを提唱する(図 5.15)。まずヌクレオチドフリーで微小管に結合した頭部に ATP が結合するとネックリンカーがドッキングし、加水分解反応が起きる。ADP-Pi 状態から微小管が解離すると弱結合状態となるが、この状態ではネックリンカーがまだドッキングしており、ADP の解離が抑制されている。そのため頭部は ADP を解離せずに微小管から解離する。微小管から解離した頭部がネックリンカーのアンドッキングを含む構造変化をすることで微小管への結合が許されるが、この構造変化には 1, 2 ms 程度の時間がかかる。頭部が再び微小管に結合すると弱結合の状態となるが、この弱結合状態では ADP の解離が許されるため、微小管の解離によって結合が安定化する。このようにしてキネシンの頭部は ATP 加水分解サイクルと共役して微小管との結合解離を繰り返すと考えられる。

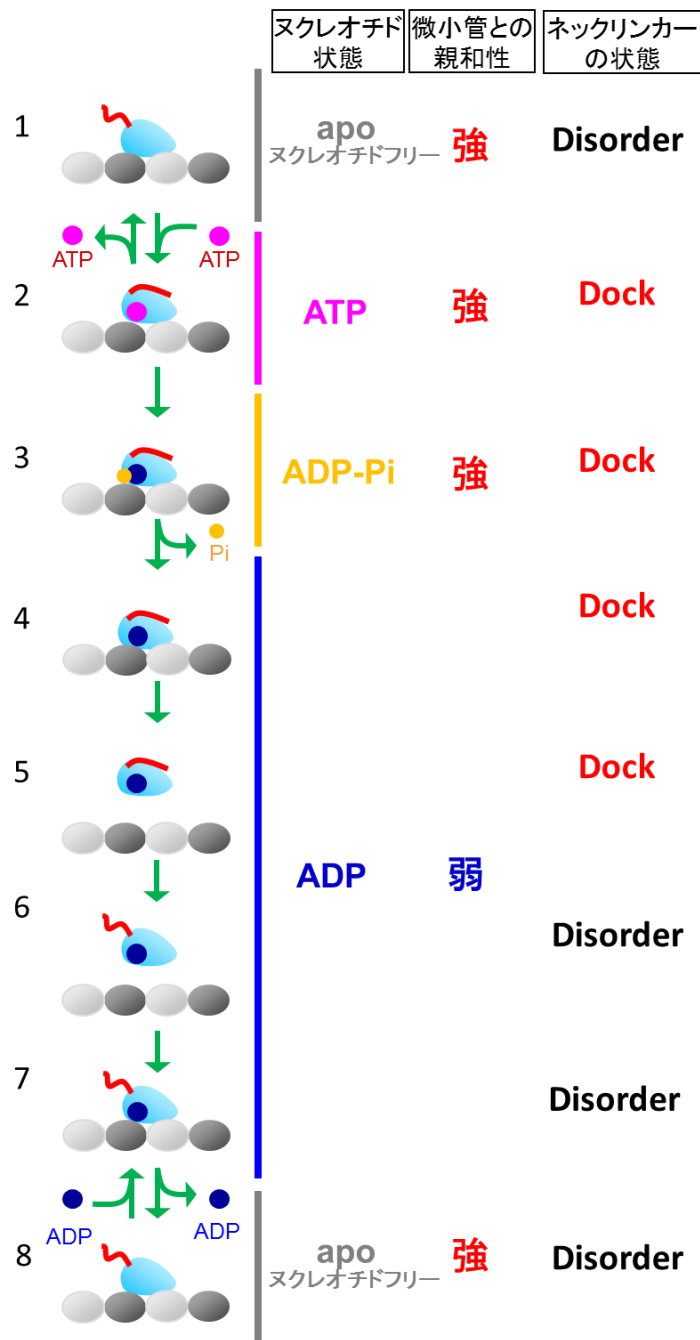


図 5.15 キネシン頭部の新しい加水分解サイクル

2つのADP-微小管結合状態（4, 7）は構造的に異なっており、4ではADPの解離が抑制されるが7ではADPの解離が許される。これら2状態間の遷移は頭部が浮いた状態で行われる（5→6）。

第 6 章 本研究のまとめ

キネシンの協調的な二足歩行を制御する仕組みはまだよくわかっていない。過去の研究によりネックリンカーが重要であることが明らかになっているが、ネックリンカーによる制御の仕組みは明らかになっていない。また、ATP 加水分解後の弱結合状態の頭部からの ADP 解離の抑制も効率的なエネルギー変換に重要であるが、その仕組みは明らかになっていない。本研究ではこれらの制御の仕組みを理解するために、3 つの実験を行った。

6.1 実験結果のまとめ

E236A ヘテロダイマーを用いた前頭部の解離速度の定量的測定

E236A ヘテロダイマーを用いることで後ろ頭部を固定し、野生型頭部の運動を観察することで両足結合状態の前頭部の解離を観察した。解離にかかる時間を測定することで、両足結合状態の前頭部では解離速度が後ろ頭部よりも 40 倍程度遅いことを明らかにした。この結果から、前頭部では ATP 加水分解が抑制されていることが直接示された。

また、ネックリンカーを伸長し前頭部でネックリンカードッキングをしやすいとした変異体を用いて前頭部の解離速度を測定した結果、ネックリンカーを伸長しない場合の半分程度の時間で解離することが明らかになった。この結果から、前頭部における ATP 加水分解の抑制にはネックリンカーにかかる後ろ向きの張力が重要であることが明らかになった。

タンデムキネシンの運動観察による浮いた頭部の選択的前方ステップを説明する 2 つのモデルの検証

浮いた頭部の選択的結合において、Biased diffusion メカニズムと Biased binding メカニズムのどちらがより重要であるか明らかにするため、Biased diffusion メカニズムと Biased binding メカニズムを交互に使って運動すると考えられる変異体キネシン、タンデムキネシンの運動を観察し、ステップの解析を行った。

まず N-head、C-head およびリンカーの中央を標識し、ステップサイズを測定する

ことでタンデムキネシンが **Hand-over-hand** で運動することを確かめた。続いて **N-head** または **C-head** を標識したトレースの **Unbound** 状態を分類することで **N-head**, **C-head** それぞれの再結合確率を測定した。その結果、**N-head** では再結合は **ATP** 濃度によらず 10 %程度の低い確率に抑えられている一方、**C-head** ではネックリンカードッキングにより前方にステップしやすくなるものの飽和 **ATP** 条件下でも 34 %と高い確率で再結合することが明らかになった。**Unbound** 状態の持続時間を測定することにより、**N-head**, **C-head** のどちらでもステップの結果や **ATP** 濃度を問わず **Unbound** 状態の持続時間は 2, 3 ms 程度であることが明らかになった。ネックリンカードッキングにより拡散運動を移動させる仕組みを持たない **N-head** の場合では野生型の二量体と比べて有意に遅かったもののその差は 1 ms 程度であり、十分効率的に前方にステップしていることが明らかになった。また、**Bound** 状態の持続時間を測定、解析することにより、**C-head** はネックリンカードッキングなしには前方ステップできないことや、**N-head** における **ATP** 加水分解速度は **C-head** よりも 4 倍程度高いことが明らかになった。**C-head** の前方ステップにネックリンカードッキングが必要であることはネックリンカーに変位を加えてドッキングを阻害した変異型タンデムキネシンの運動観察によっても確かめられた。また、**Unbound** 状態の変位の二次元ヒストグラムを作成することにより、**N-head** の拡散運動は **C-head** と比べて前方にバイアスを受けているわけではなく、再結合確率の違いは **Biased binding** メカニズムによるものであることが明らかになった。

以上の結果から、キネシンの選択的前方ステップに **Biased binding** メカニズムが不可欠であり、**Biased diffusion** メカニズムはそれほど重要でないことが明らかになった。**C-head** がネックリンカードッキングなしに前方にステップできないことから、ネックリンカードッキングは前方へのステップの促進ではなくむしろ前方へのステップの制御に重要であることが示唆された。

アンカーモノマーを用いた浮いた頭部の構造変化の検証

キネシンの頭部が解離してから結合するまでにかかる時間を測定するために、アンカーモノマーを用いて単頭のキネシンを微小管上に係留し、同一の分子の微小管との連続的な解離結合を観察した。**ATP** 条件下でアンカーモノマーの運動を観察し、**Unbound** 状態の持続時間を測定した結果、微小管から解離した頭部は 3 ms 程度の時間をかけて再び微小管に結合することが明らかになった。この結果から、浮いた頭部の構造変化の

存在が示唆された。また、ATP-Pi 条件下で運動を観察した結果、Bound 状態の持続時間が長くなり Unbound 状態の持続時間が長くならなかったことから、浮いた頭部の構造変化はリン酸の解離とは無関係であることが明らかになった。続いて、ADP 条件下で運動を観察し、Unbound 状態の持続時間を測定した結果、ADP が結合し微小管から解離した頭部は 1 ms 程度で微小管に結合することが明らかになった。この結果から、ATP 加水分解サイクルにおける、ATP 加水分解後と微小管への結合後の 2 つの ADP-微小管結合状態は構造的に異なっており、解離後に 1, 2 ms かけて構造変化することが示唆された。

浮いた頭部の構造変化はネックリンカーのアンドッキングを含む構造変化であるという仮説を立て、ADP 条件に硫酸イオンを加えることでネックリンカーをドッキングしやすくし運動を観察した。その結果、10 ms 以上の長い Unbound 状態が観察された。この結果は、ADP が結合しネックリンカーがドッキングした状態の頭部は微小管に結合できないことを意味しており、この結果から、2 つの ADP-微小管結合状態における ADP 状態の解離の制御はネックリンカーのドック状態の違いによりなされており、浮いた頭部の構造変化はネックリンカーのアンドッキングを含む構造変化であることが示唆された。

6.2 キネシンの効率的二足歩行におけるネックリンカーの役割

本研究で明らかになった結果をもとに、キネシンの効率的二足歩行におけるネックリンカーの役割を論じる。

6.2.1 ネックリンカーの向きによる ATP 加水分解の制御

キネシン頭部への ATP が結合すると頭部後方の R ドメインが反時計回りに回転することで ATP の結合が安定化するが、このとき ATP 結合部位の反対側で疎水的残基の集まった疎水ポケットが溶媒に露出するため回転後の状態は不安定である。ネックリンカーの付け根付近の疎水的な I325 残基は疎水ポケットに特異的に結合することで回転後の状態を安定化し ATP の可逆的解離が抑制され ATP 異性化が促進される。二量体の前頭部ではネックリンカーが後ろに引っ張られているため疎水基が疎水ポケットに結合することができず、R ドメイン回転後の状態が安定しない。そのため ATP の結合が安定せず ATP 加水分解が阻害される。一方、二量体の後ろ頭部ではネックリンカーが前に引っ張られているため疎水基と疎水ポケットの結合が促進され、R ドメイン回転後の状態が安定する。そのため ATP の可逆的な解離が抑制され ATP 加水分解が促進される (図 6.1)。このようにして両足結合状態の二量体では後ろ頭部が選択的に解離すると考えられる。

6.2.2 Biased binding メカニズムによる浮いた頭部の選択的前方ス

テップ

浮いた後ろ頭部が後方の結合サイトに結合するためには、後ろ頭部がヌクレオチドフリーの両足結合状態になる必要がある。ヌクレオチドフリー状態ではネックリンカーの付け根が $\alpha 4$ ヘリックスのすぐ後ろに位置するため、後ろ頭部がヌクレオチドフリーの両足結合状態では $\alpha 4$ ヘリックスが立体障害となりネックリンカーが引き伸ばされる形になる。ヌクレオチドフリーや ADP 状態でドッキングしていないネックリンカーはエ

ントロピーばねとして振る舞うため、浮いた頭部が後方の結合サイトで ADP を解離しようとするときネックリンカーに強い張力がかかる。この張力によって ADP の解離が阻害されると考えられる。一方、浮いた頭部が前方に結合する場合にはネックリンカーは立体障害の影響を受けないため強い張力は受けない。したがって、前方に結合する場合には ADP の解離は阻害されないと考えられる。このように前後の結合サイトにおける結合能の違いによって頭部は前方に選択的にステップする。

また、微小管に結合した頭部がヌクレオチドフリーの状態から浮いた頭部が前方に結合しようとした場合でも後ろ頭部がヌクレオチドフリーの両足結合状態を取る必要があるため、この状態でも同様にネックリンカーに強い張力がかかるため前方への結合が阻害される。この制御の仕組みによりステップ後の頭部は必ず後ろ頭部に ATP が結合した状態となるため、後ろ頭部の解離が促進されると考えられる。

このようにしてキネシンは 2 つの頭部を交互に動かして効率的に二足歩行していると考えられる (図 6.2)。

6.2.3 ネックリンカードッキングによる、弱結合状態の頭部における

ADP 解離の制御

キネシンの ATP 加水分解サイクルには ATP 加水分解後と結合後の 2 回の ADP-微小管結合状態が存在する。ATP が無駄に消費されずに頭部の解離に変換されるためには ATP 加水分解後の頭部では ADP の解離が抑制され、結合後では ADP の解離が許され頭部の結合が安定化するという異なる制御を受ける必要がある。これらの制御はネックリンカーのドッキング状態の違いによりなされており、ATP 加水分解後の頭部ではネックリンカーがドッキングしたままの状態であるために ADP の解離が阻害されていると考えられる。その後解離した頭部でネックリンカーのアンドッキングを伴う構造変化が起きることで ADP を解離できる状態になり、再び結合すると ADP が解離し結合が安定したヌクレオチドフリー状態に移行すると考えられる。このようにネックリンカーは ADP 解離の制御に重要な役割を果たしていると考えられる (図 5.14)。

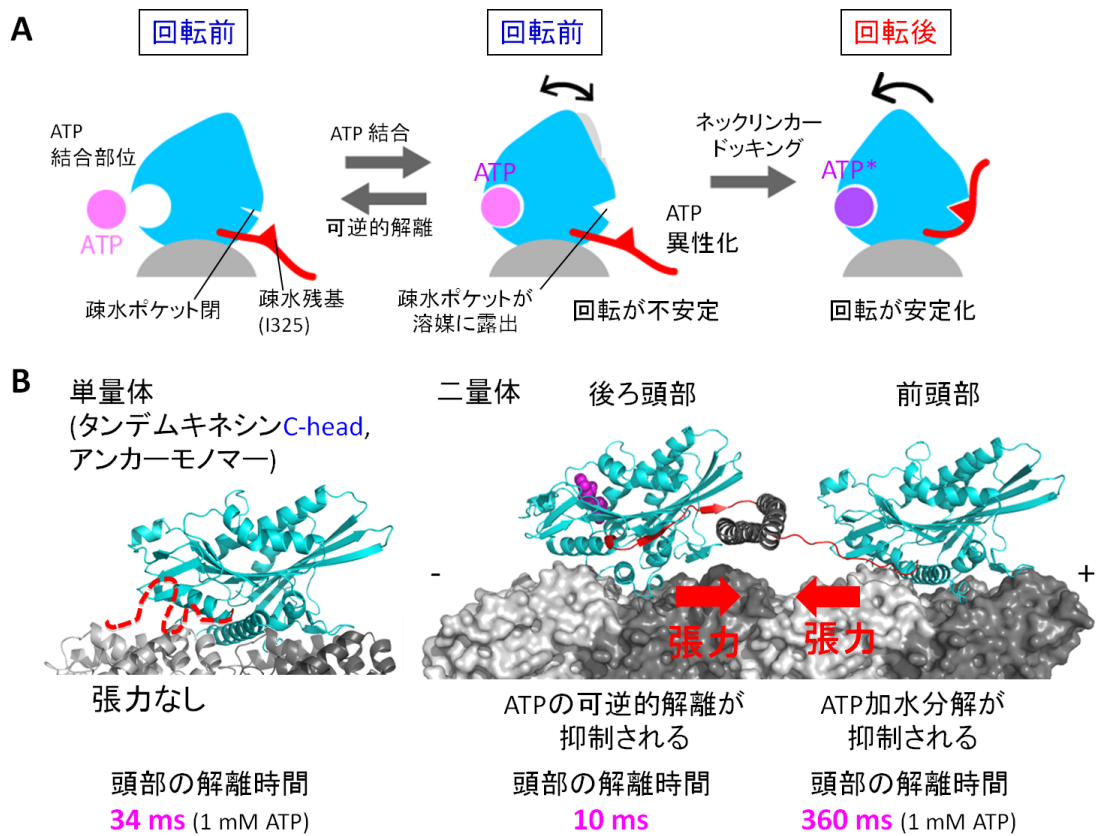


図 6.1 ネックリンカーによる ATP 加水分解の制御 ([Ling, 2012]より引用、一部改変)

(A)ネックリンカーによる頭部の回転制御。ATP 結合部位に ATP が結合すると頭部が回転するが、このとき反対側で疎水ポケットが溶媒に露出するため回転が不安定である。ネックリンカーの疎水残基 (I325) が疎水ポケットに結合すると回転後の状態が安定化し ATP の可逆的解離が抑えられ、ATP 加水分解反応が進行する。(B)単量体および二量体における ATP 加水分解速度。後ろ頭部ではネックリンカーに前向きの張力がかかることでネックリンカードッキングが促進され ATP の結合が安定化し、加水分解が促進される。一方前頭部ではネックリンカーに後ろ向きの張力がかかることでネックリンカードッキングが阻害され、ATP 加水分解が阻害される。

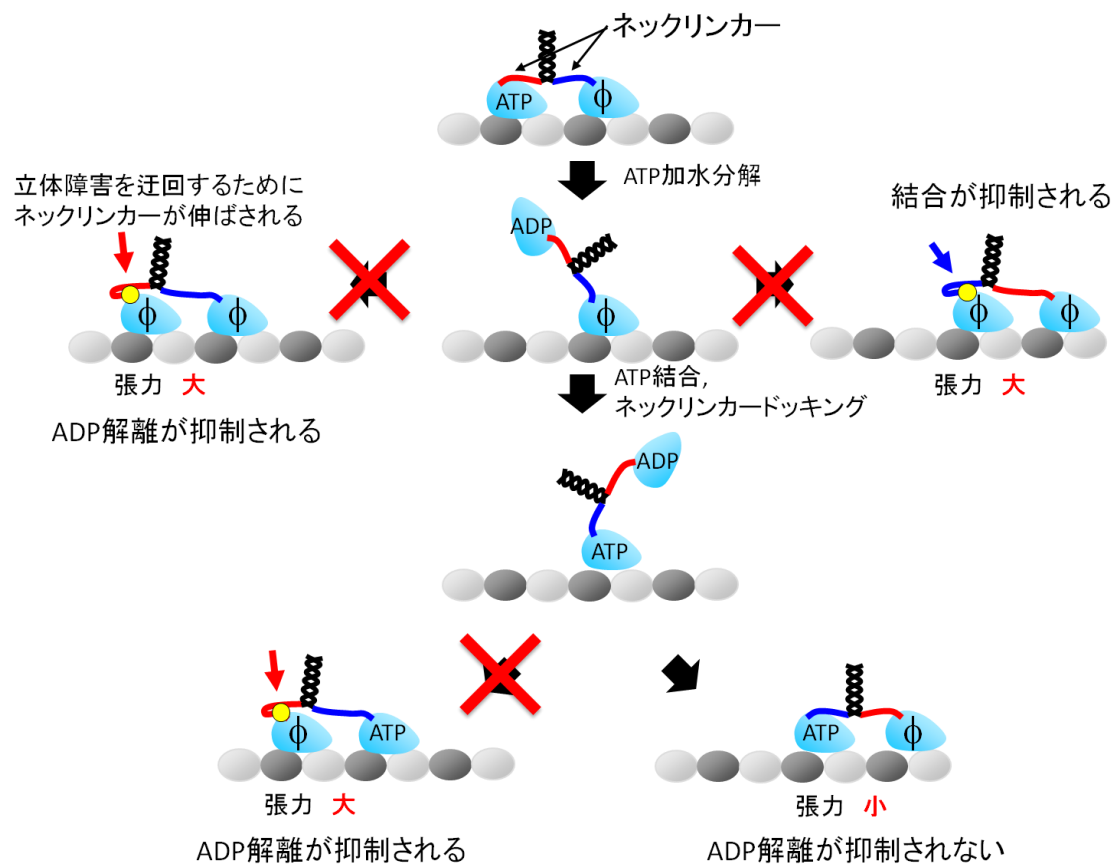


図 6.2 Biased binding メカニズムによる選択的前方ステップ

浮いた頭部が後方の結合部位でADPを解離しようとする時立体障害によりネックリンカーが引っ張られ強い張力がかかるため、ADPの解離が抑制される。また、ネックリンカードッキング前に前方にステップしようとすると同様にネックリンカーに強い張力がかかるため結合が抑制される。ネックリンカー後に前方にステップする場合はADP解離によりネックリンカーが引き伸ばされず強い張力がかからないためADPの解離は抑制されない。

謝辞

本論文を完成させるにあたり、多くの方々にご協力いただきました。

富重道雄先生には研究全般にわたるご指導をいただきました。野地博行先生には共同研究に賛同していただき、全反射暗視野顕微鏡を使わせていただきました。上野博史さんには我々の研究室で全反射暗視野顕微鏡を立ち上げる際に助言をいただきました。榎佐和子さん、皆川慶嘉さんには顕微鏡やソフトウェアの使い方のご指導や、顕微鏡の予約などのサポートをしていただきました。酒井洋子さん、田中明美さんには DNA コンストラクトの作成をしていただきました。新谷大和さんには研究全般にわたる様々な助言をいただきました。東京大学富重研究室および青山学院大学富重研究室的メンバーには研究生活全般にわたる支えになっていただきました。

ここに記して、感謝の言葉にかえさせていただきます。

2018年1月9日 松崎興平

参考文献

- [Amos, 1974] Linda A. Amos, A. Klug, "Arrangement of subunits in flagellar microtubules", *J. Cell Sci.* 14: 523-549, 1974
- [Cao, 2014] L. Cao, W. Wang, Q. Jiang, C. Wang, M. Knossow and B. Gigant, "The structure of apo-kinesin bound to tubulin links the nucleotide cycle to movement." *Nat. commun.*: 6364, 5364, 2014.
- [Clancy, 2011] B. R. Clancy, W. M. Behnke-Parks, J. O. L. Andresson, S. S. Rosenfeld, S. M. Block, "A universal pathway for kinesin stepping", *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: 1020-1027, 2011
- [Gigant, 2013] B. Gigant, W. Wang, B. Dreier, Q. Jiang, L. Pecqueur, A. Plückthun, C. Wang & M. Knossow, "Structure of a kinesin-tubulin complex and implications for kinesin motility", *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 1001-1007, 2013
- [Gilbert, 1995] Susan P. Gilbert, Martin R. Webb, Martin Brune, Kenneth A. Johnson, "Pathway of processive ATP hydrolysis by kinesin", *Nature* 373: 671-676, 1995
- [Guydosh, 2009] N. R. Guydosh, S. M. Block, "Direct Observation of the binding state of the kinesin head to the microtubule", *Nature* 461: 125-129, 2009
- [Hackney, 1992] D. D. Hackney, J. D. Levitt, & J. Suhan, "Kinesin undergoes a 9S to 6S conformational transition", *Biol. Chem.* 267: 8696-8701, 1992.
- [Hackney, 1994] D. D. Hackney, "Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6865-6869, 1994
- [Hirokawa, 1989] N. Hirokawa, K. K. Pfister, H. Yorifuji, M. C. Wagner, S. T. Brady, G. S. Bloom. "Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration", *Cell* 56: 867-78, 1989
- [Hua, 1997] W. Hua, E. C. Young, M. L. Fleming and J. Gelles, "Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis." *Nature* 388: 390-393, 1997.
- [Isojima, 2013] H Isojima, "分子モーターキネシンの一方向性運動を決める仕組み", 東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻博士論文, 2013
- [Isojima, 2016] H. Isojima, R. Iino, Y. Niitani, H. Noji, M. Tomishige, "Direct observation of intermediate states during the stepping motion of kinesin-1", *Nat. Chem. Biol.* 12: 290-297, 2016
- [Kirschner, 1984] Tim Mitchison, Marc Kirschner, "Dynamic instability of microtubule growth", *Nature* 312: 237-242, 1984
- [Kojima, 1997] H. Kojima, E. Muto, H. Higuchi, & T. Yanagida "Mechanics of single

kinesin molecules measured by optical trapping nanometry.", *Biophys J.* 73: 2012-2022, 1997.

[Lawrence. 2004] Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LS, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh JR, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy AS, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE, Wordeman L." A standardized kinesin nomenclature", *J. Cell Biol.* 167: 19–22, 2004.

[Ling, 2012] X. Ling, "Role of the neck linker on the ATP hydrolysis reaction of kinesin.", 東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻博士論文, 2012

[Makino, 2010] T. Makino, "キネシン1の協調的な二足歩行運動を可能にする構造基盤の解析", 日本生物物理学会第48回年会: 1P190, 2010

[Matsuzaki, 2013] K. Matsuzaki, "キネシン頭部の微小管への選択的結合の一分子観察", 東京大学工学部物理工学科卒業論文, 2013

[Mori, 2007] T. Mori, R. D. Vale and M. Tomishige, "How kinesin waits between steps", *Nature* 450: 750-754, 2007

[Niitani, 2015] Y. Niitani, "Coordinated Catalysis and Walking Mechanism of Molecular Motor Kinesin (分子モーターキネシンの頭部間協調性の仕組み)", 東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻博士論文, 2015

[Rice, 1999] S. Rice, A. W. Lin, D. Safer, C. L. Hart, N. Naber, B. O. Carragher, S. M. Cain, E. Pechatnikova, E. M. W. Kubalek, M. Whittaker, E. Pate, R. Cooke, E. W. Taylor, R. A. Milligan and R. D. Vale, "A structural change in the kinesin motor protein that drives motility," *Nature* 402: 778-784, 1999.

[Romberg, 1993] L. Romberg and R. D. Vale, "Chemomechanical cycle of kinesin differs from that of myosin," *Nature* 361: 168-170, 1993.

[Schimmel, 1967] P. R. Schimmel, P. J. Flory, "Conformational energy and configurational statistics of poly-L-proline", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 52-59, 1967

[Schinitzer, 1997] M. J. Schnitzer and S. M. Block, "Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step", *Nature* 388: 386-390, 1997

[Shiroguchi, 2011] K. Shiroguchi, H. F. Chin, D. E. Hannemann, E. Muneyuki, E. M. De La Cruz, K. Kinoshita, "Direct Observation of the Myosin Va Recovery Stroke That Contributes to Unidirectional Stepping along Actin", *PLoS Biol* 9(4): e1001031, 2011

[Sindelar, 2002] C. V. Sindelar, M. J. Budny, S. Rice, N. Naber, R. Fletterick, R. Cooke, "Two conformations in the human kinesin power stroke defined by X-ray crystallography and EPR spectroscopy.", *Nat. Struct. Biol.* 9: 844-848, 2002

- [Svoboda, 1993] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp and S. M. Block, "Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry," *Nature* 365: 721-727, 1993.
- [Svoboda, 1994] K. Svoboda, S. M. Block, "Force and velocity measured for single kinesin molecules." *Cell* 77: 773-84, 1994.
- [Tomishige, 2000] M. Tomishige and R. D. Vale, "Controlling Kinesin by Reversible Disulfide Cross-linking: Identifying the Motility-producing Conformational Change.", *J. Cell Biol.* 151: 1081–1092, 2000.
- [Ueno, 2010] H. Ueno, S. Nishikawa, R. Iino, K. V. Tabata, S. Sakakihara, T. Yanagida, and H. Noji "Simple Dark-Field Microscopy with Nanometer Spatial Precision and Microsecond Temporal Resolution." *Biophys. J* 98: 2014-2023, 2010
- [Vale, 1985] R. D. Vale, T. S. Reese, M. P. Sheetz. "Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility", *Cell* 42: 39–50, 1985
- [Vale, 1996] R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, T. Yanagida, "Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules", *Nature* 380: 451-3, 1996
- [Vale, 2000] R. D. Vale, R. A. Milligan, "The Way Things Move: Looking Under the Hood of Molecular Motor Proteins, *Science* 288: 89-95, 2000
- [Vale, 2003] R. D. Vale, "The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport," *Cell* 112: 467-480, 2003.
- [Woehlke, 1997] G. Woehlke, A. K. Ruby, C. L. Hart, B. Ly, N. Hom-Booher and R. D. Vale, "Microtubule Interaction Site of the Kinesin Motor", *Cell.* 90: 207–216, 1997.
- [Yildiz 2003] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, "Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization", *Science* 300: 2061-2065
- [Yildiz, 2004] A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale and P. R. Selvin, "Kinesin Walks Hand-Over-Hand", *Science* 303: 676-678, 2004.
- [Yildiz, 2008] A. Yildiz, M. Tomishige, A. Gennerich and R. D. Vale, "Intramolecular Strain Coordinates Kinesin Stepping Behavior along Microtubules", *Cell* 134: 1030-1041, 2008